



Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a deteção e quantificação de um alergénio do amendoim

ÂNGELO MIGUEL SILVA PINTO
novembro de 2020



Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a deteção e quantificação de um alergénio do amendoim

Ângelo Miguel Silva Pinto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia de Computação e Instrumentação Médica

Orientadores:

Doutor Hendrikus Nouws

Doutor João Paulo Pacheco

Porto, novembro de 2020

Agradecimentos

Após a realização do projeto de investigação que se realizou no GRAQ, não posso deixar de não agradecer às pessoas que estiveram constantemente a apoiar-me durante a realização deste trabalho.

Inicialmente quero agradecer ao doutor João Pacheco por durante meses me ter aconselhado e me guiado neste projeto, assim como a capacidade de transmitir a informação de forma simples e fácil compreensão.

Quero também agradecer a todo o grupo que trabalha no GRAQ, pela ótima receção, simpatia e disponibilidade em me ajudar quando era necessário. Um agradecimento especial à investigadora Maria Silva, que para além de colega de bancada, ajudou a orientar-me dentro do laboratório.

Ao doutor Hendrikus Nouws e ao engenheiro Carlos Ramos, pois sem eles, este projeto não era possível de se realizar.

A todas as pessoas da minha família que me ajudaram, um agradecimento enorme, à minha mãe, ao meu pai, tia Rosa, prima Diana e Carolina e Lara e ainda a todas as minhas amigas inclusive a Daniela Martins, Ana Silva, Tânia Peixoto e Inês Silva, um obrigada a toda pelas palavras de apoio e pelo o apoio emocional que me deram nesta jornada. A eles dedico todo o meu esforço e trabalho.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) / Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais (UIDB/50006/2020) e através do projeto TracAllerSens - Sensores eletroquímicos para a deteção e quantificação de vestígios de alérgenos em produtos alimentares (POCI-01-0145-FEDER-030735), financiado pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização na sua componente FEDER e pela FCT na sua componente nacional

Resumo

Ara h 1 é uma proteína que provoca reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis e que pertence a um leque de proteínas alérgicas do amendoim. As alergias alimentares têm vindo a ser alvo de estudo, pelo facto de estas terem vindo a aumentar, inclusive a alergia ao amendoim. Os diagnósticos são realizados através de testes da picada, controlados em ambientes que sejam capazes de responder a uma eventual reação aguda.

O conhecimento precoce da hipersensibilidade à Ara h 1 torna-se um ponto crucial para melhorias na qualidade de vida de qualquer pessoa, para isso é essencial o conhecimento da existência, mesmo em condições vestigiais, desta em produtos alimentares. Neste contexto, na UE encontra-se em vigor legislação que exige que informação acerca de uma lista prioritária de ingredientes alérgicos seja indicada no rótulo de alimentos pré-embalados, isolados e preparados. No entanto, esta legislação só se foca na indicação de ingredientes e não na quantidade dos mesmos no alimento. Isto tem levado à adoção de indicações preventivas como “pode conter vestígios de...” por parte da indústria. Estas indicações restringem desnecessariamente a dieta de consumidores alérgicos, podendo levar a atitudes de risco que conduzem à exposição aos alergénios. Assim, tanto para consumidores alérgicos como para a indústria alimentar e as entidades reguladoras, informações acerca da presença e a quantidade de alergénios nos alimentos levará a condições mais seguras e lucrativas. Isto exige o desenvolvimento de métodos para a deteção de quantidades vestigiais de alergénios em alimentos. Assim, neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico seletivo para Ara h 1.

Devido ao seu baixo custo, facilidade de preparação, portabilidade e sensibilidade, os sensores eletroquímicos apresentam-se como uma boa solução para a deteção rápida de alergénios. Recentemente a combinação da tecnologia de polímeros molecularmente impressos (MIPs), com as técnicas eletroquímicas tem permitido a preparação de sensores de alta seletividade.

Neste trabalho foram utilizados elétrodos (*screen-printed*) de carbono descartáveis para a preparação de um sensor molecularmente impresso seletivo para a Ara h 1. A preparação do MIP foi realizada por eletropolimerização, recorrendo à voltametria cíclica (CV), diretamente na superfície do elétrodo de trabalho, um monómero funcional, o pirrol, e a Ara h 1. Foram otimizadas várias condições de polimerização, tais como, concentração de pirrol, concentração de Ara h 1, número de ciclos de polimerização, condições de extração e realizou-se uma caracterização do sensor por voltametria cíclica. O sensor mostrou uma resposta linear entre as concentrações de Ara h 1 entre 2 e 10 ng/mL.

Palavras-chave: Alergias Alimentares; Alergénio; Sensor Eletroquímico; Ara h 1; Polímero Molecularmente Impresso.

Abstract

Ara h 1 is a protein that causes allergic reactions in hypersensitive individuals and belongs to a range of allergic proteins from peanut. Food allergies have been the subject of study, because they have been increasing, including allergy to peanut. The diagnoses are carried out by sting testing, in controlled environments that can respond to an eventual acute reaction.

The early knowledge of Ara h 1 hypersensitivity becomes a crucial point to improve the quality of life of any person. Therefore, it is essential to know the presence, even in trace amounts, of this allergen in food products. In this context, in EU legislation is in place that requires information on a priority list of allergic ingredients to be indicated on the label of pre-packaged, isolated and prepared foods. However, this legislation only focuses on the indication of ingredients and not on the quantity of these ingredients in the food. This has led to the adoption of preventive indications such as “may contain traces of...” by the industry. These indications unnecessarily restrict the diet of allergic consumers, which may lead to risky attitudes leading to exposure to allergens. Thus, for both allergic consumers and for the food industry and regulatory authorities, information on the presence and amount of allergens in food will lead to safer and more profitable conditions. This requires the development of methods that can detect trace amounts of allergens in food products. Thus, in this work a selective electrochemical sensor was developed for the analysis of Ara h 1.

Due to their low cost, ease of preparation, portability and sensitivity, electrochemical sensors are good solution for the rapid detection of allergens. Recently, the combination of molecularly- imprinted polymers (MIPs) with electrochemical techniques has allowed the development of highly selective sensors.

In this work, disposable screen-printed carbon electrodes were used to prepare a molecularly imprinted sensor for Ara h 1. The preparation of the MIP was carried out by electropolymerization, using cyclic voltammetry (CV), directly on the surface of the working electrode, using as a solution containing pyrrole and Ara h 1. Various polymerization conditions were optimized, such as the concentration of pyrrole and Ara h 1, the number of polymerization cycles and the extraction conditions. The sensor was characterized by cyclic voltammetry and showed a linear response between 2 and 10 ng/mL

Key-words: Food Allergies; Allergen; Electrochemical Sensor; Ara h 1; Molecularly Printed Polymer.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
1 Introdução	2
1.1 Enquadramento	3
1.2 Objetivos	3
1.3 Motivação	3
1.4 Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ).....	3
1.5 Organização do Relatório	4
2 Fundamentos Teóricos	6
2.1 Alergias.....	6
2.2 Alergias Alimentares	10
2.3 Imunoglobulina E.....	12
2.3.1 Manifestações Clínicas da Imunoglobulina E (IgE).....	14
2.4 Ara h 1.....	15
2.5 Sensores Químicos.....	16

2.5.1 Sensores eletroquímicos.....	17
2.5.2 Voltametria	18
2.6 Eléttodos serigrafados (SPE).....	21
2.6.1 Polímeros molecularmente impressos (MIPs)	23
2.6.2 Pirrol e MIPs	25
3 Materiais e Métodos.....	25
3.1 Reagentes	25
3.2 Soluções	26
3.3 Equipamento	26
3.4 Preparação do Polímero Molecularmente Impresso	26
3.5 Medições Eletroquímicas.....	27
4 Resultados e Discussão	28
4.1 Caracterização do comportamento eletroquímico da Ara h1	28
4.1.1 Estudo por Voltametria Cíclica.....	28
4.2 Desenvolvimento de um sensor seletivo para Ara h 1	29
4.2.1 Impressão Molecular.....	32
4.2.2 Otimização das Condições de Polimerização	36
4.2.2.1 Concentração de Pirrol (Py).....	36
4.2.2.2 Concentração de Ara h 1	37
4.2.2.3 Número de Ciclos	38
4.2.2.4 Solventes de extração.....	40

4.2.2.5 Tempo de Extração	41
4.2.2.6 Tempos de Incubação	41
4.2.3 Caracterização do Sensor	41
4.2.4 Reta de calibração	43
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	45
Referências.....	48

Índice de figuras

Figura 1-Etiologia dos episódios de anafilaxia [4]	7
Figura 2- Mecanismos subjacentes à anafilaxia humana. Traduzido de [9]	8
Figura 3- Poster de “Anafilaxia: Diagnóstico e Tratamento” do Grupo de Interesse de “Anafilaxia e Doenças Imunoalérgicas Fatais” (GANDALF) da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (SPAIC), retirado de [10].....	9
Figura 4- Classificação das reações alimentares em relação à sua mediação. Adaptado de [12]	12
Figura 5-Produção de IgE, que é realizada de duas maneiras. Adaptado e traduzido de [22].	14
Figura 6- Representação da aplicação do potencial em voltametria cíclica [57].....	20
Figura 7- Representação da aplicação do potencial em voltametria de varrimento linear	20
Figura 8-Representação da aplicação do potencial e medição da corrente em voltametria de onda quadrada	21
Figura 9-Esquema de SPCE [58]	22
Figura 10-Esquema Au-SPE. Retirado de [58].....	23
Figura 11-Estrutura do Pirrol, retirado de [57]	25
Figura 12-Voltamogramas cíclicos relativos ao estudo do comportamento eletroquímico da Ara h 1 20 µg/mL em tampão fosfato 0,1M pH 7 usando SPCE. Velocidade de varrimento de 100 mV/s.....	29
Figura 13-Esquema de construção de um sensor MIP e o seu funcionamento. adaptado de [61].....	31
Figura 14-Voltamogramas registados durante polimerização por CV. A) Voltamogramas da polimerização de um NIP; B) Voltamograma da polimerização de um MIP; C) Primeiro ciclo de polimerização de um NIP e um MIP.....	33
Figura 15-Voltamogramas DPV do NIP e MIP, após a polimerização e após a extração.....	35

Figura 16-Variação do Δi em função da concentração de pirrol em NIP e MIP	36
Figura 17- Variação do Δi em função da concentração de Ara h 1 para o MIP	37
Figura 18-Variação do Δi em função do número de ciclos, NIP (as barras verdes) o MIP (barras azuis).....	38
Figura 19-Voltamogramas DPV de solventes de extração, após extração	40
Figura 20-Characterização de cada etapa da construção dos sensores NIP e MIP	42
Figura 21-Resposta do MIP às diferentes concentrações de Ara h 1	43
Figura 22-Curva de calibração do sensor MIP	44

Índice de tabelas

Tabela 1-Relato dos sintomas em três categorias. Adaptado de [12]	15
Tabela 2- Áreas de interesse da química onde é aplicada a CV. [49].....	19

Lista de Abreviaturas

AA	Alergias Alimentares
AC	Corrente Alternada (<i>Alternating Current</i>)
Ara h 1	<i>Arachis hypogaea 1</i>
CA	Cronoamperometria
CD79	Grupo de Diferenciação 79 (<i>Cluster of Differentiation 79</i>)
CP	Cronopotenciometria
CV	Voltametria Cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
DFI	Departamento de Física
DPV	Voltametria de Impulso Diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
EAACI	Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>)
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>)
FCT	Fundação para a Ciência e a Tecnologia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FcεRI	Recetor IgE de Alta Afinidade (<i>High-affinity IgE Receptor</i>)
GANDALF	Grupo de Interesse de “Anafilaxia e Doenças Imuno alérgicas Fatais”
GRAQ	Grupo de Reação e Análises Químicas
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
ISEP	Instituto Superior de Engenharia do Porto
ITAM	Motivo de Ativação Baseado em Tirosina Imunorreceptor (<i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LAQV	Laboratório Associado para a Química Verde
LSV	Voltametria de Varrimento Linear (<i>Linear Sweep Voltammetry</i>)
MECIM	Mestrado em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica
MIP	Polímero Molecularmente Impresso (<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
NIP	Polímero Não Impresso (<i>Non Imprinted Polymer</i>)
REQUIMTE	Rede de Química e Tecnologia
SPAIC	Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica

SPE	Eléttodos Serigrafados (<i>Screen-Printed Electrodes</i>)
SWV	Voltamtria de Onda Quadrada (<i>Square Wave Voltammetry</i>)
WE	Eléttodo de Trabalho (<i>Working Electrode</i>)

1 Introdução

Alergias alimentares são um problema de saúde pública que representam uma medida clínica urgente [1]. Estudos estimam que cerca de 1% da população portuguesa seja afetada por esta condição de saúde, e que cerca de 8,5% se apresenta em idade pediátrica [2]. Ou seja, neste momento encontramos-nos com um problema de saúde pública, sem cura, apenas com tratamento, que tem de ser rápido e eficaz. Nem sempre pode ser fácil, principalmente para crianças em que os seus cuidadores têm de transportar por segurança um injetável de epinefrina em caso de uma resposta anafilática [3]. Entre 2007 e 2017 a Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica, recolheu dados relativos a episódios de anafilaxia, expondo num artigo os resultados obtidos. Num estudo [4], através da etiologia dos episódios de anafilaxia e com discriminação de faixa etária inferior a 18 anos e faixa etária superior a 18 anos, a anafilaxia induzida por alimentos na primeira teve uma incidência de 77,1% (em 533 amostras) e na segunda 35,8% (em 1250 amostras). As principais causas foram: marisco, frutas frescas, leite, frutos secos, peixe, ovos, amendoins, sementes, cereais, carnes entre outros. Os amendoins (*Arachis hypoganea L.*) são consumidos amplamente em países Ocidentais, Ásia e África [5]. Estas espécies contêm 6 alergénios desde a Ara h 1 até Ara h 13.

Num estudo [6], foi verificado que a Ara h 2 e Ara h 6 apresentam uma bio acessibilidade na boca, podendo ser o fator que explique a sua alta taxa de alergenicidade. Em Portugal existe um grande consumo de amendoins, não só a nível social como a nível desportivo, porque este pode ser um recurso de proteína bastante económico e acessível para qualquer pessoa.

Há vários produtos que podem conter vestígios de amendoim e outros em que a sua constituição é quase apenas à base deste alimento. A manteiga de amendoim é um exemplo de preparado usado frequentemente na alimentação de indivíduos. A grande questão relacionado com a presença de amendoim não é colocada para produtos dos quais se sabe que o amendoim está presente, mas para produtos em que se indica que podem conter vestígios ou que nem apresentem no seu quadro nutricional a presença do alimento, podendo levar a que qualquer indivíduo possa vir a ter uma reação anafilática e um possível morte caso não seja devidamente tratado.

Assim sendo o foco principal deste trabalho foi o desenvolvimento dum sensor molecularmente impresso para a deteção de quantidades vestigiais do agente alergénio Ara h 1.

1.1 Enquadramento

Este projeto foi desenvolvido com o intuito de encontrar uma nova forma de deteção de alergénios que sejam do interesse para a comunidade científica e para a população em geral. Este projeto foi proposto e realizado no âmbito da unidade curricular Projeto/Estágio (PESTF) do Mestrado de Engenharia de Computação e Instrumentação Médica (MECIM) do Departamento de Física (DFI) do Instituto Superior de Engenharia do Porto.

Este projeto, que decorreu no último ano de mestrado e apesar das interrupções devidas ao novo vírus SARS-CoV-2, foi elaborado no laboratório de eletroquímica do Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ).

Durante este processo existiu um acompanhamento permanente do professor Hendrikus Nouws e do investigador João Pacheco.

Este trabalho foi elaborado tem por base um projeto com financiamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) denominado TracAllerSens - Sensores eletroquímicos para a deteção e quantificação de vestígios de alergénios em produtos alimentares, da responsabilidade do professor Hendrikus Nouws.

1.2 Objetivos

O objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a deteção seletiva do Ara h1. Para este fim recorreu-se à impressão molecular, eléctrodos descartáveis e técnicas de voltamétricas para a quantificação do alergénio

1.3 Motivação

Este projeto acaba por ser muito interessante já que através de desenvolvimentos simples conseguiu-se perceber se uma determinada amostra possui a proteína alergénica. Esta análise pode não ser significativa para grande parte da população, mas para quem tem sensibilidade híper alérgica é essencial.

Futuramente este tipo de sensores devia ser portátil para que qualquer pessoa possa analisar e eventualmente se proteger de eventuais crises anafiláticas, pelo facto destas últimas poderem levar à morte de alguém.

1.4 Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ)

O Grupo de Reação e Análises Químicas de sigla GRAQ, consiste em uma equipa de investigadores que se dedicam à investigação na área da Engenharia Química e da Química Verde. Desde janeiro de 1999 que o GRAQ promove a inovação contribuindo para a criação, divulgação e aplicação do conhecimento.

Em novembro de 2001 o GRAQ passou a pertencer ao Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) da Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE).

O REQUIMTE foi criado para ser uma organização sem fins lucrativos em janeiro de 2003, em parceria com as universidades do Porto e Lisboa, abrangendo várias áreas, como a Química, Bioquímica, Farmacologia e Tecnologia de Alimentos.

1.5 Organização do Relatório

O presente relatório é dividido em 5 secções, a primeira consiste de uma introdução, na segunda são abordados os fundamentos teóricos sobre o trabalho, na terceira parte são apresentados os materiais e métodos utilizados, a discussão dos resultados obtidos é incluída no quarto capítulo e por último, na quinta secção apresenta-se a conclusão e propostas para trabalhos futuros.

2 Fundamentos Teóricos

Nesta secção da dissertação, irá ser apresentado um conjunto de termos e as suas definições, como também fundamentos teóricos essenciais para a percetibilidade do tema que se elaborou, começando por se falar nas alergias, depois de forma mais específica em alergias alimentares e todos os seus componentes envolventes

2.1 Alergias.

No mundo atual e com o avanço tecnológico, a área da saúde procura a compreensão de novas doenças e assim o tipo de tratamentos a que devem ser submetidos os pacientes. Porém em pleno séc. XXI apesar do conhecimento que já existe ainda há doenças sem cura.

De acordo com a Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI) o termo alergia é descrito como uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos específicos [7]. Sendo a hipersensibilidade relatada como o termo que se usa para descrever os sintomas ou sinais que são iniciados por estímulos [7]. Na realidade, o termo alergia só faz sentido quando o individuo demonstra hipersensibilidade acima da dose tolerada comparada a indivíduos dito saudáveis, na qual o seu sistema imunológico não reage de forma exagerada. Assim, “define-se como alergia a hipersensibilidade do organismo a algo ingerido, inalado ou simplesmente tocado” [8]. Existem um leque de doenças como asma alérgica, rinite alérgica, conjuntivite alérgica, dermatite, urticária, hipersensibilidade alimentar, hipersensibilidade a drogas, picada de insetos ou hipersensibilidade à picada e anafilaxia [7].

Os gatilhos das alergias são intitulados de alergénios e geralmente são proteínas [8]. Neste caso de estudo, a hipersensibilidade alimentar é o foco principal. O termo mais apropriado quando os anticorpos IgE estão envolvidos é o de alergia alimentar. Numa análise ao soro sanguíneo, pode-se verificar a presença de pelo menos dois tipos de anticorpos os IgE e IgG. Estes últimos, não tem importância clínica, mas quando presentes no soro, informam já uma prévia exposição do corpo ao agente alergénico.

Em Portugal, existe uma sociedade médica dedicada ao relato e estudo de alergias, a Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Esta publica revistas anuais, de forma a mostrar avanços dos estudos na área da alergologia.

“A anafilaxia é uma emergência médica por excelência tratando-se de uma reação e hipersensibilidade sistêmica grave e potencialmente fatal” [4], esta reação de hipersensibilidade é a resposta a uma reação alérgica. *Gaspar A. Et al.* [4], elaboraram esquemas de etiologia dos episódios de anafilaxia em Portugal durante 10 anos (2007-2017) (Figura 1. Através de uma análise da Figura 1, a anafilaxia por alimentos é em idade pediátrica, ou seja, menores de 18 anos, bastante elevada, sendo um dos motivos mais preocupantes, tanto para médicos, investigadores e população geral. Contudo, em fase adulta a anafilaxia induzida por alimentos é bastante inferior. Também se pode observar que os seres humanos, em qualquer fase das suas vidas, podem tornar-se intolerantes a determinados compostos sejam eles alimentares, farmacológicos ou entre outro dos referidos na Figura 1.

Etiologia da anafilaxia	Total de doentes n=1783 (%)	< 18 anos n=533 (%)	≥ 18 anos n=1250 (%)
Anafilaxia induzida por alimentos	859 (48,2%)	411 (77,1%)	448 (35,8%)
Anafilaxia induzida por fármacos	659 (36,9%)	57 (10,7%)	602 (48,2%)
Anafilaxia por picada de insetos	132 (7,4%)	24 (4,5%)	108 (8,6%)
Anafilaxia induzida pelo exercício (dependente de alimentos – 44)	45 (2,5%)	12 (2,3%)	33 (2,6%)
Anafilaxia induzida pelo látex	41 (2,3%)	6 (1,1%)	35 (2,8%)
Anafilaxia induzida pelo frio	40 (2,2%)	21 (3,9%)	19 (1,5%)
Anafilaxia idiopática	36 (2,0%)	5 (0,9%)	31 (2,5%)
Outras causas (imunoterapia específica – 4; epitélio de cavalo – 2; <i>Anisakis simplex</i> – 1)	7 (0,4%)	3 (0,6%)	4 (0,3%)

Figura 1-Etiologia dos episódios de anafilaxia [4]

Em muitos indivíduos a anafilaxia possui um mecanismo imunológico subjacente bem definido, geralmente envolvendo IgE, recetores FcεRI, mastócitos, basófilos e libertação de citocinas, quimiocinas e mediadores químicos de inflamação, como histamina e triptase [9]. No esquema da Figura 2 estão apresentados os mecanismos relacionados à anafilaxia humana, em que esta pode ser mediada pelo sistema imunológico ou pode ocorrer por via não imune dos mastócitos, a anafilaxia idiopática, considerada como um diagnóstico de exclusão e revela ser uma forma de elucidar melhor os mecanismos fisiopatológicos.

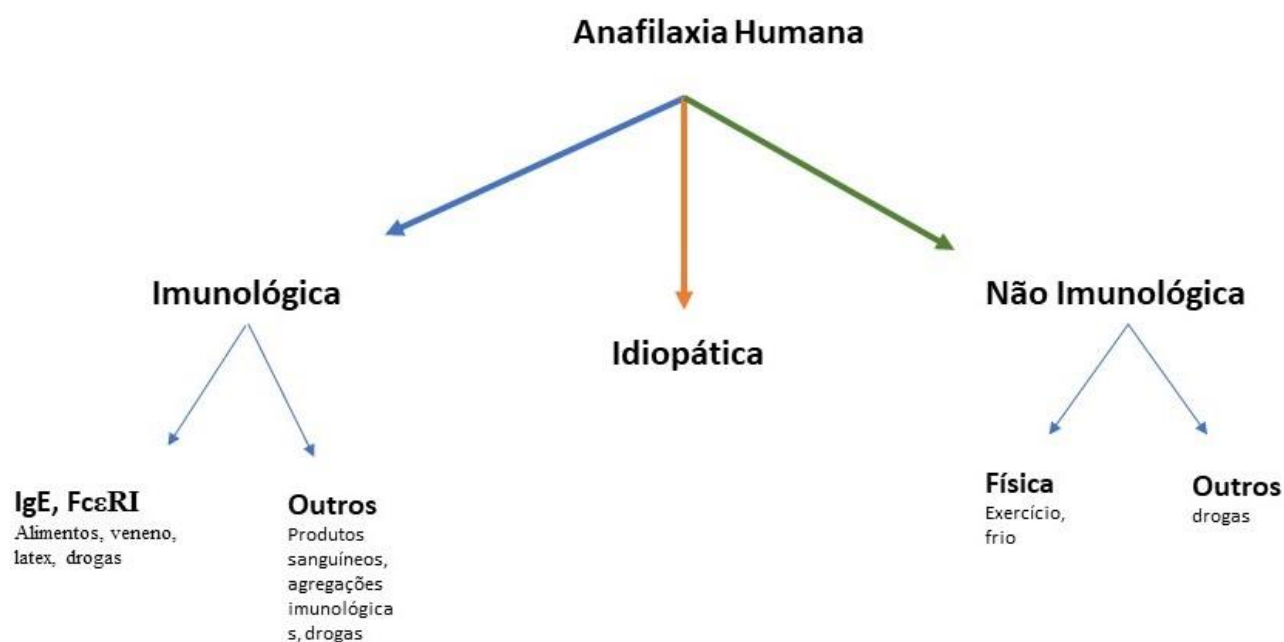


Figura 2- Mecanismos subjacentes à anafilaxia humana. Traduzido de [9]

Em 2018, o Grupo de Interesse de “Anafilaxia e Doenças Imuno alérgicas Fatais” (GANDALF) da SPAIC apresentou um trabalho elaborado para melhorar o conhecimento e a forma de abordagem em relação a anafilaxia e as suas consequências. Assim, foi apresentado um poster na Revista Acta Médica em fevereiro de 2018. “Relativamente ao diagnóstico da anafilaxia, que é exclusivamente clínico, optou-se por usar imagens para ilustrar os três cenários em que deve ser considerado. Estas imagens inspiradas e produzidas pela World Allergy Organization” [10]. O poster está apresentado na Figura 3, ilustrando os sintomas e tratamentos.

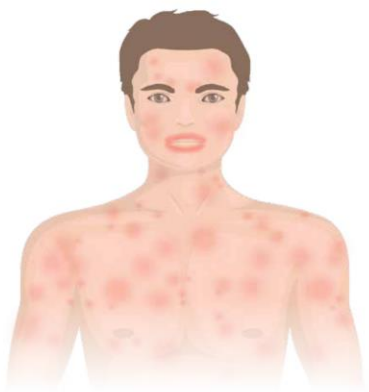
DIAGNÓSTICO

TRATAMENTO

REAÇÃO SISTÊMICA GRAVE, NA PRESENÇA DE PELO MENOS UM DOS TRÊS CRITÉRIOS CLÍNICOS SEGUINTE:

INÍCIO SÚBITO (minutos a poucas horas) de:
Envolvimento da pele ou mucosas e pelo menos um dos seguintes:
Compromisso respiratório ou Hipotensão / sintomas associados

SINTOMAS DA PELE OU MUCOSAS



Urticária, eritema ou prurido generalizado;
edema dos lábios, da língua ou da úvula

SINTOMAS RESPIRATÓRIOS



Dispneia, pieira, broncospasmo, estridor, hipoxemia

+

HIPOTENSÃO OU SINTOMAS ASSOCIADOS



Hipotonia (colapso), síncope, incontinência de esfínteres

OU

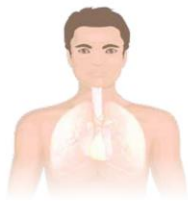
INÍCIO RÁPIDO após exposição a um ALERGÊNIO PROVÁVEL PARA O DOENTE
(minutos a poucas horas) de **2 OU MAIS** dos seguintes:

SINTOMAS DA PELE OU MUCOSAS



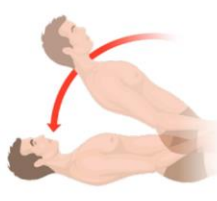
Urticária, eritema ou prurido generalizado; edema dos lábios, da língua ou da úvula

SINTOMAS RESPIRATÓRIOS



Dispneia, pieira, broncospasmo, estridor, hipoxemia

HIPOTENSÃO OU SINTOMAS ASSOCIADOS



Hipotonia (colapso), síncope, incontinência de esfínteres

SINTOMAS GASTROINTESTINAIS SÚBITOS E PERSISTENTES



Cólica abdominal, vômitos

OU

HIPOTENSÃO após exposição a ALERGÊNIO CONHECIDO PARA O DOENTE (minutos a poucas horas)

(Pressão sistólica <90mmHg * OU queda >30% em relação ao seu basal)

*nas crianças <1 ano de idade - inferior a 70 mmHg; 1-10 anos - inferior a [70 mmHg + (2x idade)]

1º PASSO (executar simultaneamente)

AVALIAR

Vias aéreas (Airways), Respiração (Breathing), Circulação (Circulation), Estado de consciência (Disability), Pele (Exposure)

ADRENALINA IM

Mesmo na ausência de hipotensão ou choque | Dose: 0,01mg/Kg (máx: 0,5mg/dose);
Solução aquosa, 1:1000 (1mg/mL); na face anterolateral da coxa

MEDIDAS GERAIS

POSICIONAR o doente

Decúbito dorsal com membros inferiores elevados | Semi-sentado se **dispneia** | Posição lateral de segurança se **vômitos ou perda de consciência** | Decúbito lateral esquerdo se **grávida**

MONITORIZAR o doente

(frequência cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória, saturação de O₂)

Se possível **REMOVER O ALERGÊNIO** conhecido ou provável

Administrar **O₂ SUPLEMENTAR** (10-15 L/min; FiO₂ ~40-80%)

Considerar colocação de **ACESSO VENOSO PERIFÉRICO**

Colheita de sangue para **TRIPTASE** (primeiros 30 a 90min ou até 6h após início dos sintomas)



2º PASSO (executar concomitantemente ou em seqüência)

ADMINISTRAR ANTI-HISTAMÍNICO

Preferencialmente oral e não sedativo (até 4 vezes a dose diária)

Se necessário **EV ou IM: CLEMASTINA** 0,025mg/kg/dose (máx: 2mg) ou **HIDROXIZINA** 1mg/Kg/dose (máx: 100mg)

ADMINISTRAR CORTICÓIDE

Preferencialmente oral: Metilprednisolona ou Prednisolona 1-2 mg/kg/dose

Se necessário **EV: METILPREDNISOLONA** 1-2mg/kg/dose lento (máx: 250mg) ou **HIDROCORTISONA** 4mg/Kg/dose (máx: 200mg)

REPETIR ADRENALINA IM

Se necessário repetir **ADRENALINA IM** (de 5 em 5 minutos até 3 administrações)

Dose: 0,01mg/Kg (máx: 0,5mg/dose); solução aquosa, 1:1000 (1mg/mL); face anterolateral da coxa

CONSIDERAR ACRESCENTAR:

Se BRONCOSPASMO

Salbutamol inalado:

- pMDI com câmara expansora, 50µg/Kg/dose (máx: 1000µg)

- nebulização com 0,03mL/Kg/dose (máx: 1mL)

Se HIPOTENSÃO

FLUIDOTERAPIA EV: soro fisiológico ou solução cristalóide 20mL/kg (máx: 1000mL) em infusão rápida (10 a 20 minutos). Repetir se necessário

Se sob beta-bloqueador ou hipotensão persistente

GLUCAGON EV 30µg/Kg/dose (máx: 1mg)

Anti-histamínico H₂

RANITIDINA EV 1mg/Kg/dose (máx: 50mg)



Sem melhoria? Todos os fármacos usados e em doses máximas?

Rever Diagnóstico
Rever tratamento e medidas gerais
Rever remoção do alérgeno

Considerar **ADRENALINA EV**
Solução diluída (1:10.000) em perfusão lenta (0,1µg/kg/minuto);
Sala de Emergência ou Cuidados Intensivos

Em qualquer altura:

Se **dificuldade respiratória / insuficiência respiratória refractária ou edema da glote:** **ENTUBAÇÃO** orotraqueal ou nasotraqueal

Se **paragem cardiorrespiratória:** **SUORTE AVANÇADO DE VIDA**

Após resolução dos sintomas:

Check-list para ALTA

VIGIAR pelo menos 8 a 24 horas
(de acordo com gravidade do quadro)

Prescrever anti-histamínico oral não sedativo e corticóide oral
Considerar prescrição de dispositivo **auto-injector de adrenalina** (e seu treino)
Referenciar para CONSULTA DE IMUNOALERGOLOGIA
Registrar no CPARA (Catálogo Português de Alergias e outras Reações Adversas)

Este não é só essencial para quem tem problemas de saúde que envolvam alergias, mas também para quem os rodeiam, ou seja os cuidadores, assim todos ficam informados para um eventual episódio de anafilaxia podendo evitar a morte de quem é hipersensível.

Pela análise da Figura 3, o poster demonstra 3 etapas de diagnóstico sobre reações sistêmicas graves, os sintomas relacionados na pele como a urticária e a dificuldade respiratória são os mais visíveis e os que aparecem logo após a ingestão de algum agente alergénico. No lado direito do poster da Figura 3, está presente duas fases de tratamento que são aplicadas em meio hospitalar.

2.2 Alergias Alimentares

As alergias alimentares, ou AA, são caracterizadas por abranger uma ampla variedade de condições clínicas que envolvam quebras na tolerância clínic e imunológica contra os alimentos que são ingeridos [11]. Estas alergias são definidas como respostas adversas às proteínas alimentares [12]. Podem deste modo, provocar um leque variado de conjunturas clínicas diversificadas, possibilitadas por condições mediadas por IgE e não mediadas por IgE [13]. Em 2017, a EAACI, reportou sobre as previsões primárias e secundárias para prevenir doenças alérgicas onde as mais pronunciadas como principais tópicos foram: alergias alimentares, rinite e asma [3,14].

“A alergia alimentar constitui um espectro de entidades clínicas cuja prevalência tem vindo a aumentar por razões que permanecem pouco esclarecidas” [15].

Desde que se começou a perceber quais os agentes alérgicos as investigações começaram a focar-se tanto em terapias e no entendimento das bases imunológicas das AA como na identificação de fatores externos, por exemplo o ambiente, que possam influenciar os novos estudos tais como os imuno-terapêuticos, nutricionais e a sabedoria microbiana de forma a atingir conhecimento sobre intolerâncias alimentares [16]. Existem já algumas teorias que têm vindo a ser discutidas devido ao aumento das AA como o caso na deficiência de vitamina D, o uso excessivo de antibióticos e o não consumo de alimentos alergénicos nos primeiros 7 anos de vida, podendo fazer com que haja um aumento de intolerâncias em idade mais elevada [17]. De facto, há médicos e investigadores que defendem que determinados alimentos, como por exemplo os amendoins, devem ser incrementados na dieta mesmo em idade pediátrica [3].

AA não são intolerâncias alimentares alias são o oposto a estas últimas. Intolerância, seja qual for, é definida como reação não imune, que exclui mecanismos metabólicos, tóxicos, farmacológicos e indefinidos [18]. Por isso, não é correto dizer que alergia alimentar é uma intolerância, porque AA não são doenças, mas um conjunto de desordens clinico-patológicas [12].

Não é novidade que as AA podem comprometer a vida de uma pessoa, porém estas podem acabar de forma dramática com a mesma. É referido num estudo [8], que as AA podem resultar numa considerável mortalidade, comprometimento da qualidade de vida e um aumento de gastos com a saúde. São geralmente apresentadas como parte de uma constelação de doenças alérgicas, conhecidas como marcha atópica ou alérgica [19]. Inicialmente nos primeiros anos de vida, ou seja, em idade pediátrica, pode aparecer a dermatite atópica seguida por alergias alimentares cingidas entre os 2 e 5 anos. E para não terminar a “marcha”, em idade escolar, a partir dos 6 anos, aparecem os sintomas de asma e rinite alérgica.

Na realidade, AA são uma reação adversa a um antigénio, caracterizando-se como alergénios alimentares [20]. Num panorama geral acontece que o corpo reage a determinadas substâncias nocivas presentes em certos alimentos, provocando assim, uma reação imune a pessoas que não sejam inócuas a esse tipo de antigénios [21]. Em termos científicos diz-se que, o sistema imunológico de indivíduos não alérgicos, ou saudáveis, ou tolerantes à imunidade, são capazes de discriminar os antigénios patogénicos, sendo capazes de não responder a antigénios alimentares [20], que de uma maneira ou de outra irão destabilizar a saúde do indivíduo.

Em Portugal as AA são um fenómeno que afeta cerca de um terço da população, em que 8,5% são de idade pediátrica e ao longo dos últimos anos verificou-se que têm vindo a crescer de forma exponencial. As alergias alimentares afetam a vida e limitam as pessoas nas suas escolhas. Um indivíduo é suscetível a ficar intolerante em qualquer idade, sendo que oito alimentos causam as principais reações alérgicas, sendo: leite, ovos, amendoins, nozes, soja, trigo, peixe e marisco [19].

Dentro das doenças associadas à AA imuno-mediada estão: urticaria aguda ou angioedema, síndrome de alergia oral, dermatite atópica, doença gastrointestinal eosinofílica, dermatite alérgica de contacto e síndrome de enteropatia ou enterocolite induzida por proteínas alimentares [12]. É de notar que quando se fala de alimentação e AA, estas acabam por ser desvalorizadas, porque “sabe-se que a asma pode ser grave, mas a alergia alimentar não é valorizada como causa de quadros muitos aflitivos” [8], mas mesmo em doses reduzidas conseguem ser fatais. Um dos casos mais graves registados pelas respostas dessas alergias, são os choques anafiláticos, que por muitas vezes devido a ingestão involuntária ou desconhecida de um determinado ingrediente se podem suceder. “A anafilaxia é uma reação alérgica sistemática (por todo corpo) muito rápida que implica sintomas como hipotensão arterial, taquicardia, desmaio e até inchaço na zona interna da garganta, com risco de asfixia” [2]. Os

portadores destas condições têm de transportar consigo uma injeção de adrenalina para poder administrar em situações de urgência.

AA podem ser englobadas em duas categorias: IgE-mediada e IgE não-mediada, como apresentado na Figura 4.

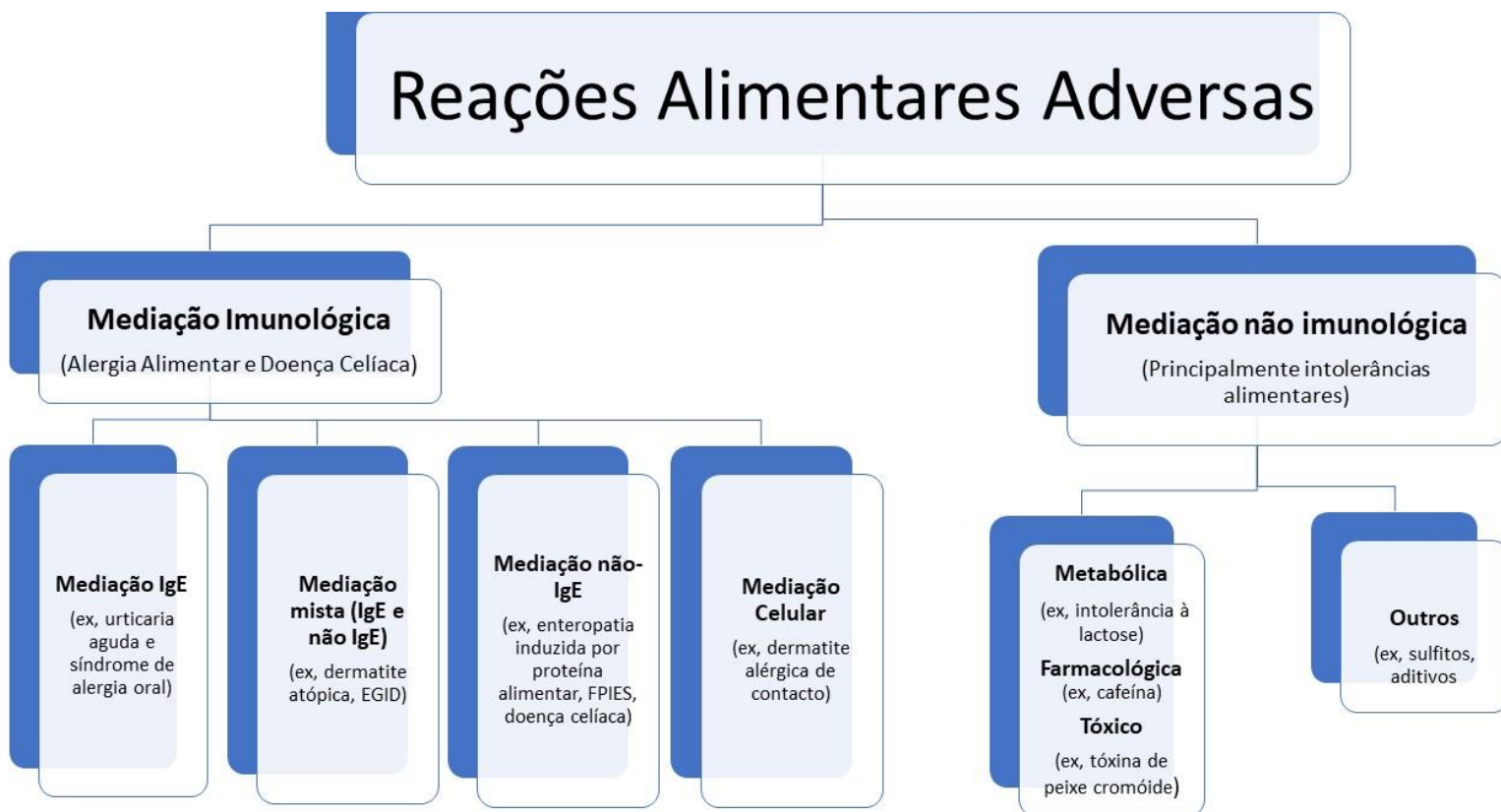


Figura 4- Classificação das reações alimentares em relação à sua mediação. Adaptado de [12]

As reações mediadas por IgE ou reações mediadas pelo anticorpo IgE, são reações de resposta rápida que normalmente desenvolve sintomas clínicos em poucos minutos a algumas horas apos a ingestão. A doença não mediada por IgE é habitualmente crônica que, por conseguinte, é mais difícil de controlar.

2.3 Imunoglobulina E

IgE trabalha de forma a mediar reações do tipo I de hipersensibilidade em que a sua principal consequência é a anafilaxia sistémica e localizada [22]. A capacidade de um fator circulante de transferir hipersensibilidade imediata específica a alergénios foi reconhecida no inicio do seculo XX e nos dias de hoje renomeada de IgE, esta é capaz de passar a resposta através de um teste cutâneo de um sujeito sensibilizado a um hospedeiro ingénuo no ensaio da anafilaxia cutânea passiva [23]. IgE apresenta na sua constituição propriedades únicas entre os

isótopos de imunoglobulina, que acarreta consequências. Uma delas é a resposta tão rápida que pode conduzir a um processo de anafilaxia fatal, e outra é quando atua como um amplificador imunológico na presença de pequenas quantidades de moléculas de IgE.

IgE é um isótopo que, em indivíduos saudáveis, se apresenta por baixas concentrações na circulação sanguínea, valores aproximados de 50-200 ng/ml, e exibem menor semivida sérica de todas as imunoglobulinas [24]. Este valor não é observado em doentes que sofram de doenças alérgicas [25].

Quando há uma perda de integridade entre componentes imunes que asseguram um estado de tolerância, ocorre AA mediada pelo anticorpo, IgE., em que a tolerância oral aos alimentos é caracterizada pelo cruzamento do antígeno alimentar através de uma barreira mucosa, processado pelas células dendríticas em um estado inativo e a indução de citocinas supressoras, como a interleucina 10 [12]. A diferenciação das células T indiferenciadas em células T reguladoras e a supressão da Th2 (células específicas dos antígenos alimentares) e supressão imunológica dos eosinófilos, basófilos e mastócitos, leva ao aparecimento dos sintomas aquando a tolerância alimentar decresce.

A descoberta do anticorpo IgE, teve grande importância para a quantificação de IgE específica de um alérgeno que é um dos principais critérios de diagnóstico e a descoberta do anticorpo anti-IgE omalizumab, que está aprovado para tratamentos de asma alérgica persistente moderada a grave, mas também é aplicada a outras doenças alérgicas [25].

Existem dois formatos dos anticorpos IgE, uma dessas formas é ligada à membrana ou, mIgE, que é expressada pelas células B que são submetidas para a classe de IgE, e a outra forma é uma secreção produzida pelas células B no plasma. mIgE serve como recetor de células B envolvidas na captação e demonstração de antígenos [25], e em combinação com sinais co-estimuladores também é possível a proliferação e diferenciação das células B.

Na Figura 5 pode-se observar estes dois meios de produção, a sinalização membranar é realizada por CD79, que apresenta um imuno-recetor de tirosina, ITAM, do qual é o motivo da ativação.

Contudo é necessário haver uma sensibilidade ao IgE específico de um alimento, este pode ser um precursor de uma AA. A deteção deste tipo de anticorpos para alérgenos no soro é usada a nível clínico para confirmar a tal sensibilidade a um alérgeno específico, não só a alimentos como a diversos agentes alérgicos.

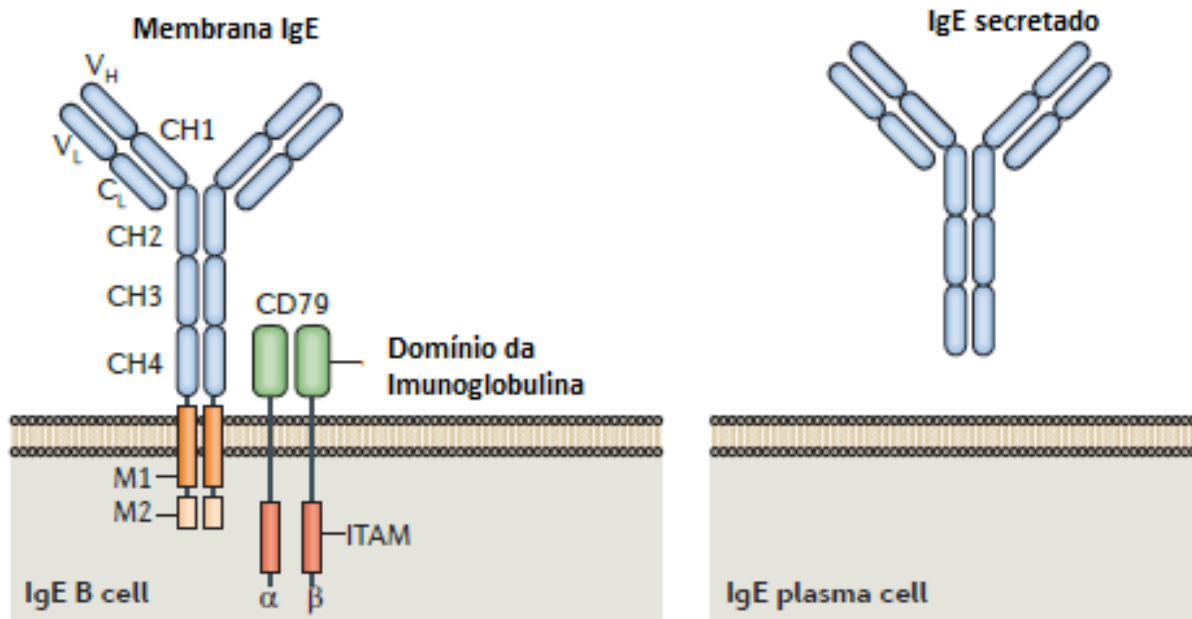


Figura 5-Produção de IgE, que é realizada de duas maneiras. Adaptado e traduzido de [22]

Quanto aos recetores de IgE, há o conhecimento de dois com diferentes afinidades. O recetor que apresenta mais afinidade com IgE é relatado como FcεRI, pelo contrário o que tem menos afinidade é o FcεRII ou também conhecido como CD23 [22]. A IgE é produzida através de vidas centrais extra foliculares. Estudos que se tem debruçado sobre a produção e a regulação *in vitro* de IgE nos últimos tempos, têm ganho grande peso na comunidade científica.

2.3.1 Manifestações Clínicas da Imunoglobulina E (IgE)

As manifestações clínicas das AA podem resultar de uma lesão imunológica mediada por interação de antígenos alimentares associados ao tecido linfático específico da mucosa do órgão alvo. Normalmente os sintomas são rápidos e evoluem de forma exponencial, num panorama que pode acabar na morte do paciente. Os sintomas envolvem quase todos os órgãos do sistema humano, desde a pele, ao trato respiratório, gastrointestinal, cardiovascular e sistemas neurológicos [26,27].

No sistema gastrointestinal a hipersensibilidade é imediata desenvolvendo-se de poucos minutos a duas horas aquando a exposição ao alérgeno alimentar que, clinicamente, apresentam náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. No sistema tegumentar, ou seja, na pele os sintomas podem permanecer durante dias e são generalizados e mostram um padrão migratório. No sistema bronquial o principal sintoma é a asma, porém broncoespasmo, sibilância e hipersecreção de muco podem provocar episódios de anafilaxia.

A Tabela 1, que foi retirada de [12], relata os sintomas nas suas três categorias: leves, moderados e severos. Estes sintomas são manifestações clínicas à mediação da imunoglobulina E, que estão relacionados com sistemas acima referidos.

Sistema de Órgãos	Sintomas	Leves	Moderados	Severos
Pele	Erupção Cutânea	Eritema fraco	Eritma	Eritema marcado generalizado (mais de 50 % da superfície corporal)
	Urticária/angioedema	<3 áreas de colmeias/ Edema de meio lábio	Mais de 3 áreas de colmeias; edema labial ou facial significativo	Inchaço generalizado de cara/lábios/olhos
	Prurido	Comichão ocasional	Comichão contínua	Comichão contínua, escoriações
Vias aéreas superiores	Espirros	Espirros ocasionais	Esfregar intermitente os olhos e nariz; espirrar frequentemente	Esfregar continuamente do nariz e olhos; rinorreia persistente
Vias aéreas inferiores	Chiar	Sibilos expiratórios	Chiado inspiratório e expiratório	Uso de músculos acessórios; chiado audível no peito; aumento do trabalho respiratório
	Manifestação Laringea	Episódios de pigarro ou tosse; aperto persistente na garganta	Rouquidão, tosse frequente	Estridor
Sistema Gastrointestinal	Sintomas subjetivos	Náuseas ou Dor abdominal leve	Dor abdominal moderada com a atividade	Mais de 3 episódios de emese ou diarreia
Cardiovascular/ Neurológico		Fraqueza subjetiva; tontura; taquicardia	Quebra de pressão sanguínea; mudança significativa do estado mental (ansiedade, confusão)	Colapso cardiovascular grave; inconsciência
Outros			Perda do controlo da bexiga	Dor pélvica

Tabela 1-Relato dos sintomas em três categorias. Adaptado de [12]

2.4 Ara h 1

Amendoins, apesar de todos os seus benefícios nutricionais, contêm treze proteínas, de Ara h 1 a Ara h 13, que são classificados como alergénios. Ara h 1, dentro das treze identificadas, é a mais reconhecida entre os pacientes hipersensíveis, mais de 90% dos pacientes com AA reagem à ingestão desta proteína.

Ara h 1 pertence à família dos vicilinos, uma proteína de armazenamento. É uma glicoproteína de massa molecular de 65 kDa, com um ponto isoelétrico de 4.55, contém um grupo sulfídrica livre na molécula e está apresentada nos amendoins como um trímero [28], e ainda é responsável por 12% a 16% da proteína total nos grãos de amendoins. Vinte e três epítomos lineares de IgE estão identificados, no entanto os epítomos de ligação a IgE são resistentes à degradação pela pepsina [29]. Embora os epítomos estejam distribuídos ao longo da sequência proteica, a maioria está localizada em duas áreas que constituem a região sobreposta entre monómeros [30]. Este alergénio apresenta uma forma homotrimérica em baixas concentrações e esta relacionada com a sua alergenicidade [31]. A forma mais estável do trímero da Ara h 1 deve-se a uma interação hidrofóbica entre monómeros, notando que as suas interações cooperativas envolvem ligações iónicas [32].

O amendoim pode ser encontrado em preparados alimentares, como ingredientes de diferentes maneiras, como crus, em manteigas, em óleos, ou ainda ser adicionado após ser submetido a processos de torrefação, fritura ou ebulição [32]. Ara h 1 é termoestável e desnatura irreversivelmente a temperaturas superiores a 80°C, porém a torrefação, processo realizado a mais de 140°C parece aumentar a capacidade de ligação de IgE à Ara h 1 [33]. Num estudo [34], foi mostrado que Ara h 1 fervida formava complexos agregados e ramificados que possuem capacidade de ligação à IgE muito reduzida. Verificaram ainda que houve um decréscimo na consequência da libertação de histamina, não muito acentuado, o que foi de interrogar, pois como a ligação de IgE diminui e pode refletir os prováveis epítomos múltiplos de IgE presentes nos agregados, que podem ser mais eficientes para a reticulação da IgE ligada à superfície [34]. A ebulição dos amendoins pode ainda reduzir a sua alergenicidade de Ara h 1, diferente da torrefação.

Ainda não há um grande conhecimento de como se pode reduzir a alergenicidade das proteínas, sendo um tema bastante estudado, não existindo há uma linha bem definida de como se pode reduzir a toxicidade destas.

2.5 Sensores Químicos

Um sensor, descrito de forma rápida, é um dispositivo que produz um sinal mensurável como resposta a um estímulo de duas naturezas diferentes, química e física. De acordo com a IUPAC em 1991, os sensores químicos são dispositivos que transformam a informação química, desde a concentração de um constituinte específico de uma amostra até a análise da composição total, num sinal analítico útil. Por outro lado, um sensor físico fornece informações sobre propriedades físicas de um sistema, como por exemplo a temperatura. [35,36]

Um sensor químico é um componente essencial de um analisador, porém este pode conter elementos que executem tarefas como: amostragem, transporte de amostra, processamento de sinal e processamento de dados. As abordagens convencionais para sensores químicos costumam fazer uso de um design “chave e fecho”, em que um recetor específico é sintetizado para ligar forte e altamente de forma seleta o analito de interesse [37].

Biossensores e sensores químicos têm atraído uma atenção considerável no ramo da química analítica moderna por causa de suas elevadas sensibilidades e seletividades. Estes tipos de sensores podem ser aplicados com uma taxa de sucesso elevada em diversas áreas, tais como diagnósticos clínicos, controlos ambientais, análises de alimentos etc... O principal componente destes sensores é o elemento de reconhecimento molecular ou biológico, também designados recetores, que reconhecem um alvo específico [38].

Os sensores químicos modernos são dispositivos eletrônicos que geram sinais tanto analógicos como digitais que transportam a informação dos analitos detetados. São dispositivos constituídos por dois componentes principais: o recetor e o transdutor. O recetor, aquando da interação com o analito alvo, pode alterar uma ou mais propriedades que o transdutor pode transformar em um sinal elétrico [39].

O reconhecimento molecular é uma forma de deteção fundamental nos processos biológicos e por isso tem sido alvo de diversos estudos, em que se pretendeu imitar o processo natural de respostas imunológicas, as de antigénio-anticorpo [39, 40].

Um polímero molecularmente impresso (MIP) é um polímero que descreve de forma mimica o processo natural imunológico, que opera com base no mecanismo “fechadura - chave”. Nos sensores, este mecanismo serve para ligar de forma seletiva e uma molécula na superfície.

2.5.1 Sensores eletroquímicos

Sensores eletroquímicos têm tido uma elevada importância nos últimos anos, assim como a fabricação de sensores analíticos usados para investigações na qualidade de alimentos, água, compostos farmacêuticos entre outros [41,42]. A forte ligação entre química e engenharia permitiu a construção de micro e nano elétrodos.

Existem vários métodos eletroquímicos, entre os quais:

- **Eletrogravimetria**

Consiste em efetuar medições de impedância eletroquímica com uma microbalança de cristal quartzo de resposta rápida usada em modo AC (corrente alternada). Esta técnica permite uma resposta de corrente, através da função de transferência elétrica e em massa pela função de transferência de massa, resultando assim numa perturbação potencial sinusoidal com pequena amplitude [43].

- **Coulometria**

É uma técnica aplicada na quantificação molar de componentes puros ou soluções consideradas como primarias. Esta técnica é muito usada para determinar a pureza dos materiais de referência [44].

- **Condutimetria**

Método que estuda a condutividade elétrica numa solução eletrolítica, a condução elétrica é devido a migração de iões após a aplicação de um potencial de corrente alternada.

- **Potenciometria**

Baseia-se na mediação de diferenças de potencial entre dois elétrodos mergulhados em soluções em condições de corrente (quase) nula [36, 45].

- **Voltametria**

Técnica eletroquímica na qual a corrente é medida em função da diferença de potencial aplicada a um eletrodo. O potencial tem de ser variado de uma maneira sistemática, resultando no voltamograma, o gráfico da corrente em função da diferença de potencial. Esta técnica é mais direcionada para fins analíticos para a análise de espécies químicas que sejam eletroativas, isto é, podem ser oxidadas ou reduzidas.

2.5.2 Voltametria

Nesta técnica o potencial do eletrodo é o parâmetro controlado que faz com que as espécies químicas sejam oxidadas ou reduzidas. Para isto são utilizados três tipos de elétrodos: o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o eletrodo auxiliar. Estes três elétrodos estão ligados a um potenciostato que controla a diferença de potencial aplicada e mede a corrente resultante [46, 47].

Na voltametria esta corrente é proporcional à concentração. A corrente pode ser intitulada de corrente catódica (redução) com sinal positivo ou anódica (oxidação) com sinal negativo. Existem assim, alguns tipos de voltametria que devem ser destacados, tais como: voltametria cíclica, Voltametria de Impulso Diferencial, Voltametria de Varrimento linear, Voltametria de Onda Quadrada, entre outras.

- **Voltametria Cíclica (CV)**

A voltametria cíclica (CV – *Cyclic Voltammetry*) é uma técnica que é bastante usada e tem uma elevada importância em estudos preliminares porque permite avaliar, entre outros, o comportamento eletroquímico das substâncias a analisar. Esta técnica destaca-se pela sua simplicidade, sensibilidade, rapidez e custo baixo o que origina assim, uma vasta aplicabilidade. A CV fornece rápidas informações sobre processos redox, como a reversibilidade, a cinética de reações de transferência eletrônica, reações químicas acopladas ou processos de adsorção [36].

A CV desempenha um papel bastante extenso na área de eletroquímica com pode ser observado na Tabela 2, em que se demonstra em que áreas da química é aplicada [49].

Áreas da química	Aplicações típicas
Química analítica	Preparação e síntese
	Análise
	Mecanismo
Química inorgânica	Interações e reações metálicas
	Caracterização de estruturas
	Análise
Química orgânica	Síntese
	Análise
	Caracterização
	Mecanismo
Química física	Estudos termodinâmicos
	Estudos cinéticos
	Equações teóricas
	Superfície e adsorção
	Análise
	Mecanismo
Bioquímica (e Biologia)	Processos metabólicos
	Monitorização contínua
	Análises <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>
	Enzimas cinéticas
	Biosensors

Tabela 2- Áreas de interesse da química onde é aplicada a CV. [49]

Na CV o potencial varia linearmente entre E1 (potencial inicial) e E2 a uma velocidade v (V/s). Quando se atinge E2 a direção do varrimento é invertida e retorna ao E1 (podem-se utilizar vários ciclos) (Figura 6). O resultado é um voltamograma em que os pontos mais importantes são os picos de corrente anódicos e catódicos assim como os seus potenciais.

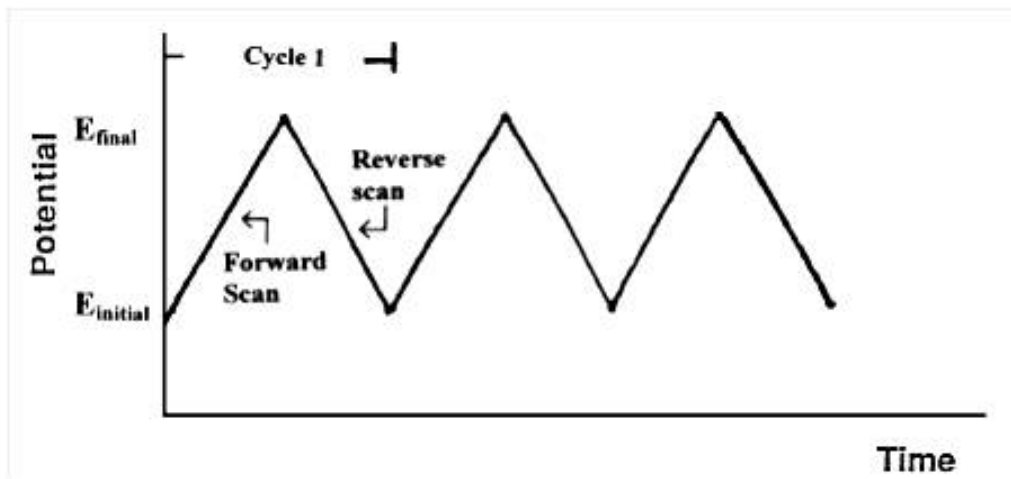


Figura 6- Representação da aplicação do potencial em voltametria cíclica [57]

- **Voltametria de Varrimento linear (LSV)**

Na voltametria de varrimento linear (LSV – *Linear Sweep Voltammetry*) são obtidos voltamogramas que têm a mesma forma de constituição que um voltamograma de CV, porém o varrimento do potencial é realizado num único sentido. Pelo gráfico da Figura 7 pode ser mostrada a aplicação do potencial. É uma técnica que, para qualquer que seja a espécie, desde que seja, eventualmente, oxidada ou reduzida na sua faixa do potencial varrido, apresentará um pico de corrente [50].

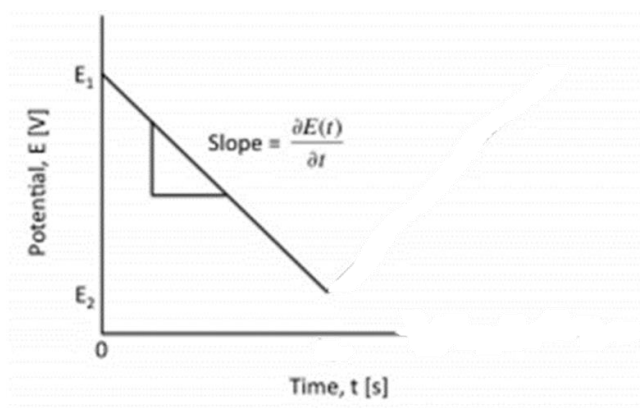


Figura 7- Representação da aplicação do potencial em voltametria de varrimento linear

- **Voltametria de Onda Quadrada (SWV)**

A voltametria de onda quadrada (SWV – *Square-Wave Voltammetry*), o potencial é aplicado no eléctrodo de trabalho através da sobreposição de uma sequência de impulsos num sinal varrimento em escada. O esquema apresentado na Figura 8, representa a maneira como é aplicado o potencial e medida a corrente na voltametria de onda quadrada. No setor A, é esquematizado um “tempo morto”, isto é, não se mede a corrente. No setor e C mede-se a corrente.

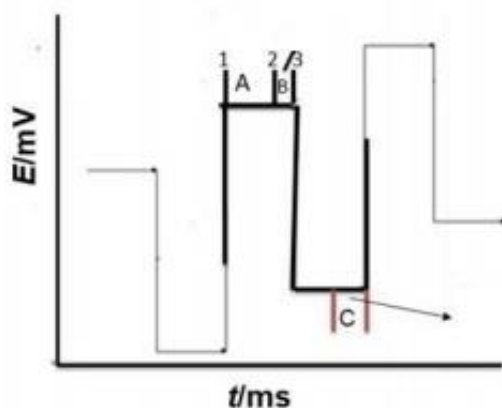


Figura 8-Representação da aplicação do potencial e medição da corrente em voltametria de onda quadrada

Uma vantagem desta técnica, esta relacionada com o facto de ser pulsada que permite minimizar a contribuição da corrente não – faradaica na corrente medida, ao contrário da técnica CV [36].

2.6 Eléttodos serigrafados (SPE)

Na voltametria são frequentemente utilizados eléctrodos serigrafados (SPE – *Screen-Printed Electrodes*). Os materiais comerciais mais comuns de que são feitos os eléctrodos do SPE são de carbono, ouro, platina e prata. Contudo tem existido uma grande procura pelo desenvolvimento de eléctrodos modificados com diversos (nano)materiais como nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de ouro e pontos quânticos (quantum dots) [51]. As principais empresas que comercializam SPEs, são: Gamry Instruments na América ou Metrohm DropSens na Europa. Destes últimos foram adquiridos os SPEs que foram usados neste trabalho. Um exemplo de um SPE de carbono (SPCE – *Screen-Printed Carbon Electrode*) está apresentado na Figura 9.

Os SPE são construídos de forma a que possam ser utilizados em vários métodos/técnicas, tais como: CV, DPV, SWV, CA (cronoamperometria) e CP (cronopotenciometria). Assim sendo estes estão considerados com boas bases para fazer análises em áreas distintas desde a parte alimentar até à parte médica (antigénios, enzimas, iões

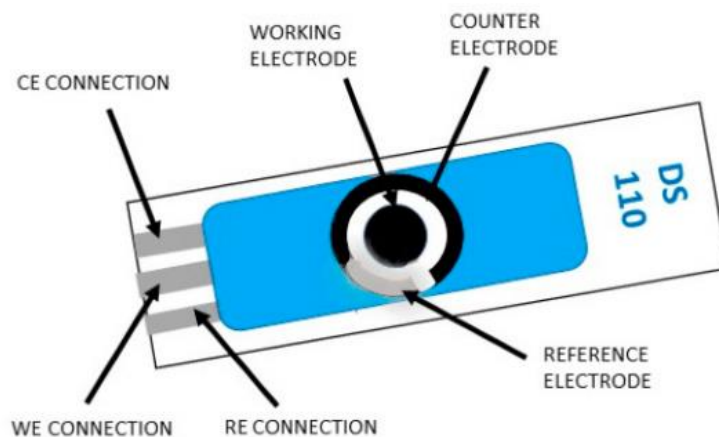


Figura 9-Esquema de SPCE [58]

metálicos pesados).

Além dos elétrodos de carbono, elétrodos de ouro também são amplamente utilizados para a detecção eletroquímica de substâncias fio [52]. Em relação ao carbono o ouro apresenta uma capacitância mais baixa e pode ser produzido num único plano ou em cristal, sendo compatível com as tecnologias de micro-fabricação [53]. Os SPE de ouro ou Au-SPE (Figura 10), têm sido aplicados em áreas como a amperometria de aminotióis em análise de injeção de fluxo e na cromatografia líquida. Estes são usados para a detecção de metais pesados, farmacêutica e mais aplicações são em biossensores como enzimáticos, imunológicos ou genosensores [52].

Os SPE são ideais para trabalhar com microvolumes e adequados para ensaios descentralizados para o desenvolvimento de (bio)sensores ou apenas sensores.

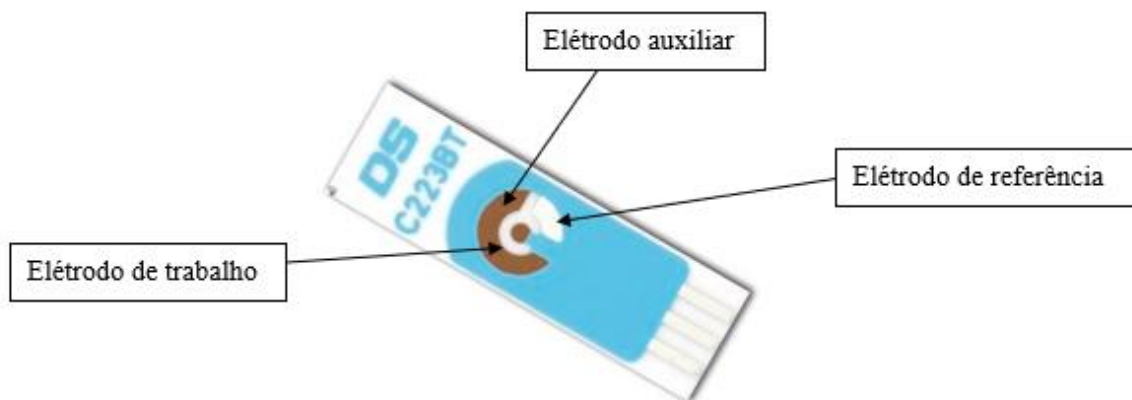


Figura 10-Esquema Au-SPE. Retirado de [58]

2.6.1 Polímeros molecularmente impressos (MIPs)

Os polímeros molecularmente impressos (MIP – *Molecularly Imprinted Polymers*) são materiais com capacidade de se ligar a moléculas alvo de forma específica, previamente selecionados para o fim. A explicação básica do reconhecimento molecular assenta na capacidade que a molécula alvo apresenta para se complementar a outra.

Os MIPs consistem em matrizes macromoleculares sintéticas desenvolvidas através de métodos de modelagem molecular, apresentando uma capacidade seletiva de se ligar a moléculas importantes do ponto de vista biológico.

Estes materiais são obtidos através da polimerização e monómeros funcionais ligados em torno de uma molécula modelo, produzindo-se um polímero de estrutura tridimensional [54].

A síntese de um MIP é um procedimento simples e barato. O MIP é preparado através de uma mistura de uma molécula modelo (o analito) com monómeros funcionais, agentes de *cross-linking* e um iniciador de num solvente apropriado. Normalmente utilizam-se um solvente aprótico e não polar. Após a polimerização extraem-se das moléculas modelo para criar cavidades específicas na rede do polímero [48,55].

É necessário ter em conta o tipo de monómero que se escolhe devido à sua capacidade de interação com os grupos funcionais da molécula modelo.

Apesar de ser uma técnica largamente usada para a preparação de sistemas de separação de sensores de moléculas pequenas, o desenho de MIPs seletivos para moléculas com elevado

peso molecular como as proteínas apresenta muitos desafios e dificuldades. O tamanho molecular, complexidade flexibilidade conformacional e solubilidade são características que se devem considerar como questões-chave.

- **Tamanho molecular**

O elevado tamanho molecular das proteínas constitui o primeiro desafio na preparação de MIP porque por um lado, aquando da polimerização, podem ficar demasiado “presas” na matriz polimérica, dificultando a sua remoção para a formação das cavidades específicas. Por outro lado, apresentam maior dificuldade de difusão pelos poros do polímero aquando da incubação, reconhecimento da mesma pelo MIP, dificultando a seletividade.

- **Complexidade**

As proteínas são compostos bastante complexos e apresentam inúmeros locais de ligação e de reconhecimento molecular. Estas possuem locais diferentes com propriedades tanto físicas e/ou químicas diversas que por sua vez podem gerar situações bastante problemáticas para o reconhecimento e de reatividade cruzada. Os MIPs apresentam boas características seletivas quando os números de locais sejam relativamente pequenos, mas com interações fortíssimas. Isto dificulta a escolha do monómero funcional e a seletividade.

- **Flexibilidade Conformacional**

Normalmente as condições não fisiológicas podem ser um fator condicionante, pelo facto de as proteínas serem bastante sensíveis a pequenas mudanças do meio, podendo deste sofrer desnaturação ou se aglomerar forçadamente, tentando-se ajustar as novas conformações devido à flexibilidade. Sendo que as condições de preparação de MIPs envolvam muitas vezes condições muito diferentes das condições onde as proteínas existam, isto é um grande desafio.

- **Solubilidade**

Um ponto crucial para o desenvolvimento de um polímero molecularmente impresso é a escolha do seu solvente. Habitualmente a escolha é quase sempre para solventes apolares, porém as proteínas não funcionam muito bem neste tipo, podem resultar numa fraca estabilidade e limita a utilização proteica, preferindo meios aquosos. Assim sendo, a maioria dos monómeros é reduzida, já que a grande parte é insolúvel ou parcialmente solúvel em água [56].

Uma das técnicas mais usadas para ultrapassar estes problemas é a polimerização em superfície (*surface imprinting*), usando por exemplo monómeros que a polimerização em solução aquosa como é o caso dos eletropolímeros. Deste modo a eletropolimerização em elétrodos é uma técnica promissora e eficaz no desenho de MIPs seletivos para proteínas.

2.6.2 Pirrol e MIPs

Como referido anteriormente MIPs são preparados por copolimerização de monómeros funcionais e de reticulação na presença de um molde solvente porogénico adequado e monómeros eletroativos que se podem polimerizar para a obtenção de polímeros condutores e/ou não condutores, sendo o maior grupo de polímeros eletronicamente condutores, ou então chamados ECPS [57,59].

Polímeros como poliacetileno, polipirrol, polianilina são exemplos da extensa variedade de polímeros condutores, sendo o oposto, ou seja, polímeros não condutores os exemplos do polifenol e polifenilenodiamina. Polipirrol (Figura 11) é um dos polímeros preparados por eletropolimerização mais amplamente e usado em sensores analíticos [60], devido à sua fácil preparação e características eletroquímicas.

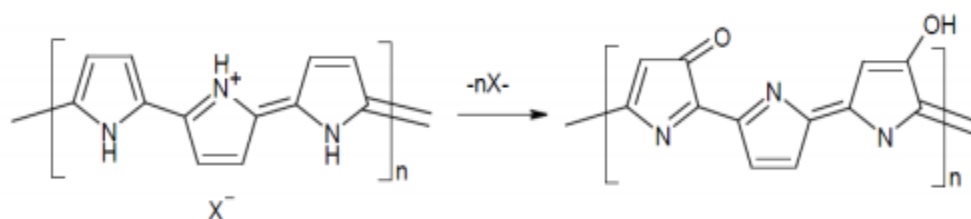


Figura 11-Estrutura do Pirrol, retirado de [57]

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo da dissertação irão ser apresentados os materiais e os procedimentos experimentais que se foram realizando ao longo do trabalho de investigação, enunciando-se os reagentes, as soluções e equipamentos para a elaboração do mesmo.

3.1 Reagentes

Os reagentes usados no desenvolvimento do trabalho experimental, foram usados como recebidos, sem qualquer tipo de alteração e sem purificação nem tratamento adicional.

Hexacianoferrato (II) de potássio (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), hexacianoferrato (III) de potássio (Sigma-Aldrich, puriss.p.a), fosfato de potássio monobásico (Riedel-de Haën, puriss) hidrogenofosfato de di-potássio (Riedel-de Haën, puriss), ácido sulfúrico (Panreac 96% PA-ISOL), cloreto de potássio (VWR chemicals, 99,8%), ácido acético glacial (VWR), dodecilo sulfato de sódio (SDS, Panreac), pirrol (Sigma Aldrich, 98%), Ara h 1 padrão (20000 ng/mL, INDOOR Biotechnologies) naturalmente putrificada, fornecida na forma líquida preparada em 1% BSA/30% glycerol/PBS, pH 7,4.

3.2 Soluções

Para a elaboração das medições eletroquímicas foram preparadas soluções tampão fosfato 0.1 M, pH 7.

Prepararam-se diariamente soluções de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0.1M.

A solução padrão de Ara h 1 foi mantida no congelador. A partir desta solução foram preparadas, por diluição, soluções com diferentes concentrações, em solução tampão fosfato 0.1M, pH 7, que foram mantidas no frigorífico a 4°C durante a elaboração do trabalho.

As soluções de pirrol foram preparadas aquando da execução das polimerizações em tampão fosfato 0.1M, pH 7, as quais se foram adicionando diferentes concentrações de Ara h 1 para a síntese dos polímeros molecularmente impressos.

Para a extração da Ara h 1, foi usado uma solução aquosa de 1% SDS/ 1% Ácido acético.

Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada (resistividade = 18.2 MΩ.cm) obtidas a partir de um sistema de purificação de água Milipore (Simplicity 185).

3.3 Equipamento

Todas as medições efetuadas foram efetuadas com um potencióstato/galvanostato da marca Metrohm Autolab (PSTAT101).

Recorreu-se ao uso de SPE de ouro (Au-SPE, marca Metrohm DropSens, modelo DRP-C223BT), assim como o uso de SPE de carbono (SPCE, marca Metrohm DropSens, modelo DRP-110).

Para a preparação de soluções e para a medição de líquidos utilizou-se material volumétrico de vidro como balões volumétricos de 10mL e 100mL e gobelés. Também se recorreu a micropipetas Eppendorf Research plus de 10, 20, 200, 1000 µL.

As pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo), com precisão de 0.00001g.

3.4 Preparação do Polímero Molecularmente Impresso

A construção do sensor MIP foi realizada por eletropolimerização diretamente da superfície dos SPCE.

Para isso, 40 µL de solução de polimerização contendo pirrol e Ara h 1 foram colocados no eletrodo, efetuando-se assim ao processo de formação de um filme polimérico usando Voltametria Cíclica numa gama de potencial entre 0.0 e +1.0V, durante 20 ciclos com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s.

Após a polimerização os eletrodos foram lavados com água ultrapura e posteriormente secos, de seguida procedeu-se à extração da Ara h1 usando o solvente de extração, adicionando-se durante duas horas alíquotas de 10 µL.

O mesmo procedimento foi efetuado para a preparação de polímeros não impressos (NIP), porém não foi adicionada Ara h1 na solução de polimerização.

3.5 Medições Eletroquímicas

No estudo do comportamento eletroquímico da Ara h1 na superfície dos elétrodos SPCE realizaram-se estudos CV de uma solução de Ara h 1 20 µg/mL em tampão fosfato 0.1M, pH 7, entre -0.2 e +1.2V.

As interações entre a Ara h 1, o NIP e o MIP foram avaliadas indiretamente através do recurso da medição do sinal eletroquímico de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0,1M. Com o uso desta solução realizou-se a medição do sinal de oxidação por DPV de -0.2 a +0.6V. Após a medição, os elétrodos foram lavados com água ultrapura e secos. Sucedeu-se à colocação de 10 µL de soluções de Ara h 1 com várias concentrações durante 15 min. Ao fim de cada 15 min usou-se água ultrapura para limpar os NIP e MIP e após secagem, foram medidas novamente os sinais por DPV nas condições mencionados anteriormente

Os MIP e NIP foram caracterizados por CV (utilizando uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0,1M) tanto após a sua construção como durante a otimização das condições experimentais.

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo da dissertação serão relatados todos os resultados obtidos das experiências realizadas, procedendo-se à discussão desses mesmos.

4.1 Caracterização do comportamento eletroquímico da Ara h 1

Inicialmente, estudou-se o comportamento eletroquímico da proteína Ara h 1, para verificar se eram observados picos de oxidação e/ou redução, de modo a que se pudesse determinar se esta seria ou não eletroativa.

Como o objetivo final deste projeto foi o desenvolvimento de um sensor para testes rápidos, simplificados, de fácil utilização e que pudessem ser, descartáveis, optou-se por se recorrer ao uso de SPCEs. O seu tamanho reduzido, permite que os volumes de amostra sejam baixos (cerca de 30 a 40 μL). Para além da última vantagem referida, também é importante referir que estes eléctrodos tem uma integração bastante fácil em dispositivos eletrónicos portáteis, assim são considerados dispositivos bastantes favoráveis para desenvolvimento de testes rápidos.

4.1.1 Estudo por Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico de uma solução de Ara h 1 20 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 0,1M pH 7, foi estudado por voltametria cíclica. Os resultados obtidos estão representados Figura 12.

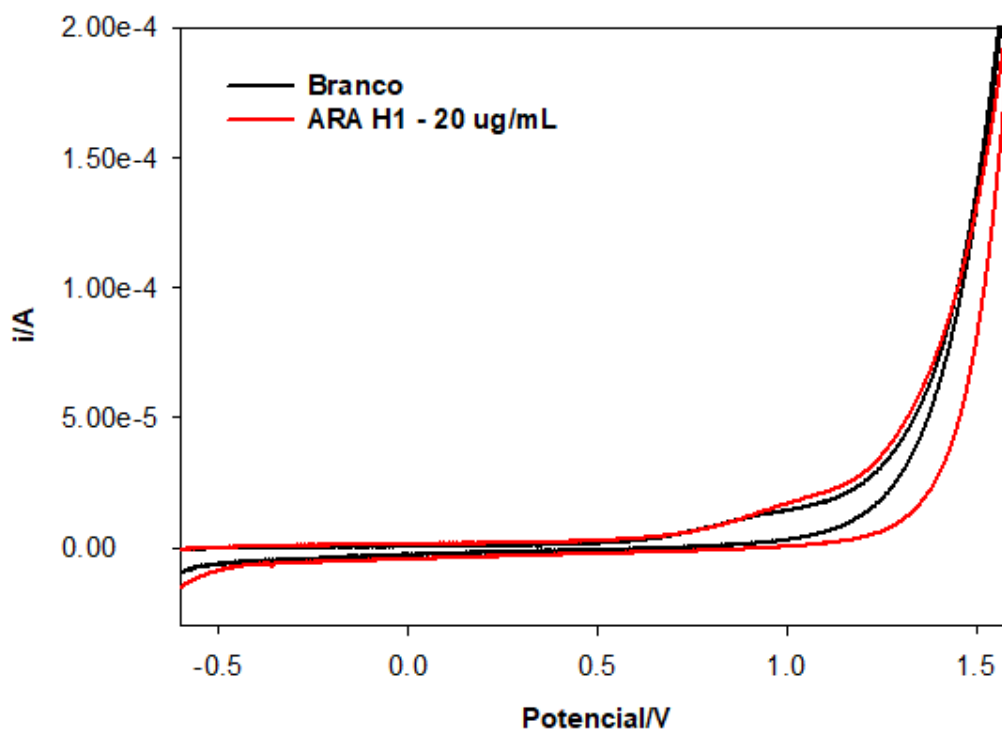


Figura 12-Voltamogramas cíclicos relativos ao estudo do comportamento eletroquímico da Ara h 1 20 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 0,1M pH 7 usando SPCE. Velocidade de varrimento de 100 mV/s

Como se pode verificar existe uma diferença muito ligeira entre do sinal branco (tampão fosfato 0,1M pH 7) e o sinal de solução contendo a proteína na gama de potenciais de -0,5 a +1,5V. Nesta gama é possível observar um aparente pico de oxidação à volta de +1,0 V. Nenhum pico de redução foi observado. Contudo, sendo o pico de oxidação de intensidade reduzida para uma concentração elevada de Ara h 1, a utilização deste pico para possível quantificação analítica torna-se muito difícil. Deste modo, na abordagem para preparação de um sensor MIP optou-se pela deteção indireta, usando um mediador redox.

4.2 Desenvolvimento de um sensor seletivo para Ara h 1

O elemento crucial de qualquer tipo de sensor é o seu elemento de reconhecimento, que irá permitir evidenciar se existe um reconhecimento do analito em questão, de maneira a este poder a vir ser analisado. Neste projeto recorreu-se à tecnologia de impressão molecular de forma a preparar um sensor específico para Ara h 1.

Surface imprinting, a técnica usada para a realização da eletropolimerização, é uma técnica que tem vindo a demonstrar bons resultados em impressão de proteínas. A impressão direta na superfície de eléctrodos possibilita controlar a espessura e a morfologia do polímero através de ajustes das condições eletroquímicas. O controlo da espessura é relativamente importante pelo facto de que quando se “imprime” uma proteína, ser necessário assegurar que esta não fique impressa de forma irreversível, podendo originar grandes dificuldades na sua extração. Ou seja, se a camada de polímero for muito fina pode não se obter um MIP eficiente, mas se for muito espessa pode ser difícil remover a proteína e de se formar as cavidades específicas. Outra das vantagens da técnica de *surface imprinting* esta relacionada com a comunicação direta e impressão de polímero e superfície do transdutor que se realizam num único passo, permitindo deste modo uma maior repetibilidade e simplicidade do processo.

Optou-se ainda por medições indiretas da Ara h 1 usando-se um par redox, tal como explicado no ponto anterior, devido à baixa resposta voltamétrica direta da Ara h 1. Foram usados SPCE, pelo facto de este permitir a formação de camadas poliméricas com facilidade. Inicialmente foram seleccionados alguns monómeros que pudessem ser testados. Todavia, após os ensaios iniciais usando pirrol concluiu-se que o uso deste seria o mais adequado e eficaz na criação de um MIP para a Ara h 1.

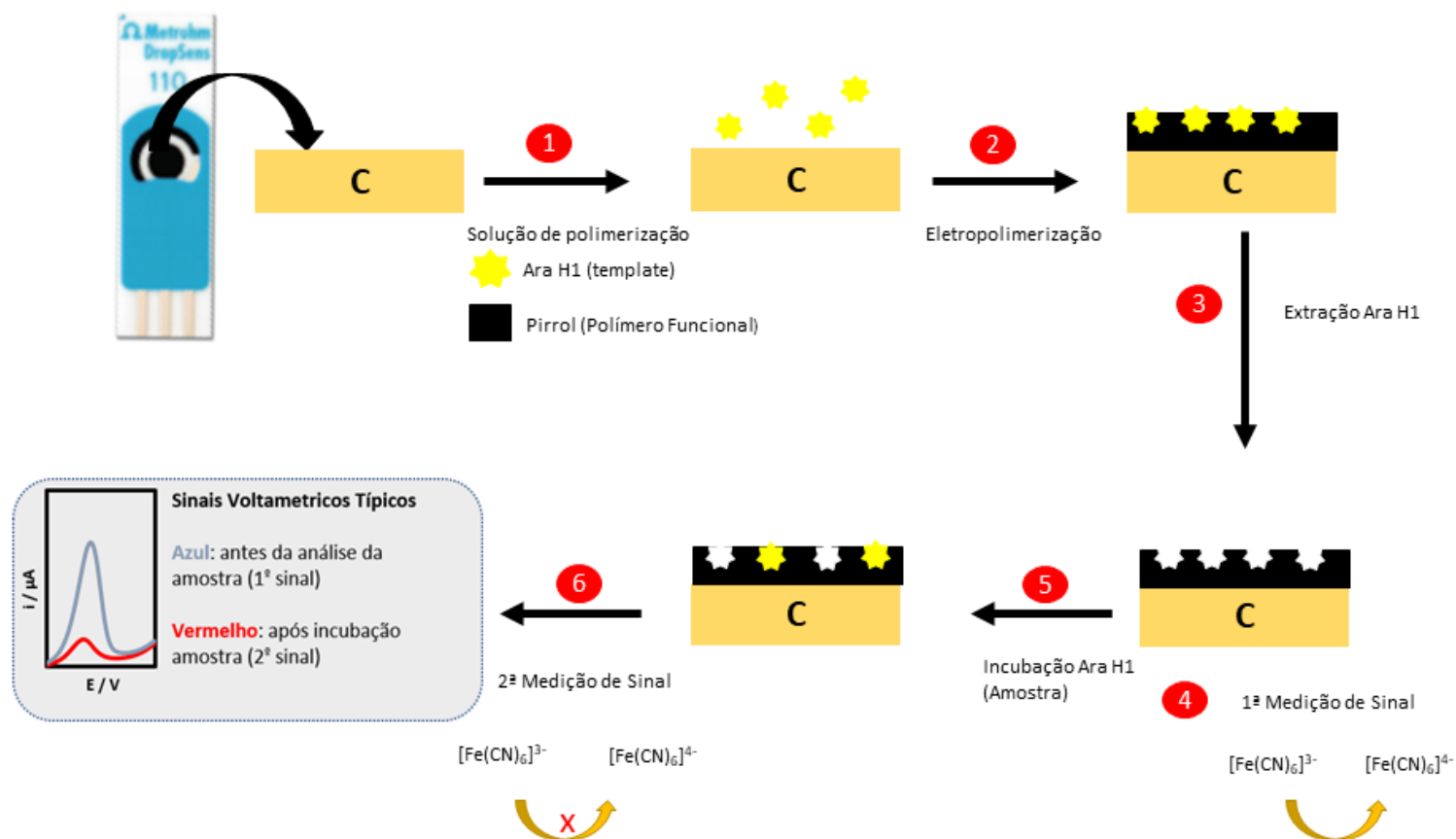


Figura 13-Esquema de construção de um sensor MIP e o seu funcionamento. adaptado de [61]

A construção e funcionamento do sensor estão representados na Figura 13, Através desta é possível verificar as etapas do desenvolvimento de um sensor MIP, sendo relatadas da seguinte maneira:

1. Consiste na preparação da solução de polimerização;
2. Nesta etapa procede-se à eletropolimerização do polímero à volta da proteína previamente adsorvida;
3. Extração da proteína, criando-se um filme polimérico com “cavidades” específicas.

É de notar que a medição não foi realizada diretamente, mas de forma indireta usando-se assim para a análise voltamétrica uma solução de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 1 mM em KCl 0,1M, para o estudo da oxidação-redução à superfície de cada eletrodo. Assim foi realizável a medição das diferenças entre os sinais de pré e pós ligação da proteína indiretamente. O modo de funcionamento do sensor envolve as seguintes restantes etapas:

4. 1ª medição do sinal eletroquímicos com “cavidades livres” usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$;
5. Incubação de Ara h 1 por determinado tempo;
6. A medição do sinal eletroquímico com os “cavidades” parcialmente ocupados usando novamente a solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

4.2.1 Impressão Molecular

A impressão molecular da proteína Ara h 1 na superfície dos SPCE, foi executada por eletropolimerização de uma solução contendo 5 mM de pirrol e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ara h 1 em tampão fosfato 0,1M pH 7. Efetuou-se a eletropolimerização por voltametria cíclica em 10 ciclos entre 0,0 V e +1,2 V. Resultando assim na formação de uma camada de polipirrol com proteína Ara h 1 impressa na superfície dos elétrodos, ou seja, um polímero molecularmente impresso.

Também se realizou o desenvolvimento de um sensor NIP que serviu de controlo, em que na sua formação apenas se usou pirrol em tampão fosfato.

Tanto no gráfico A e B da Figura 14, é possível verificar que o típico processo redox

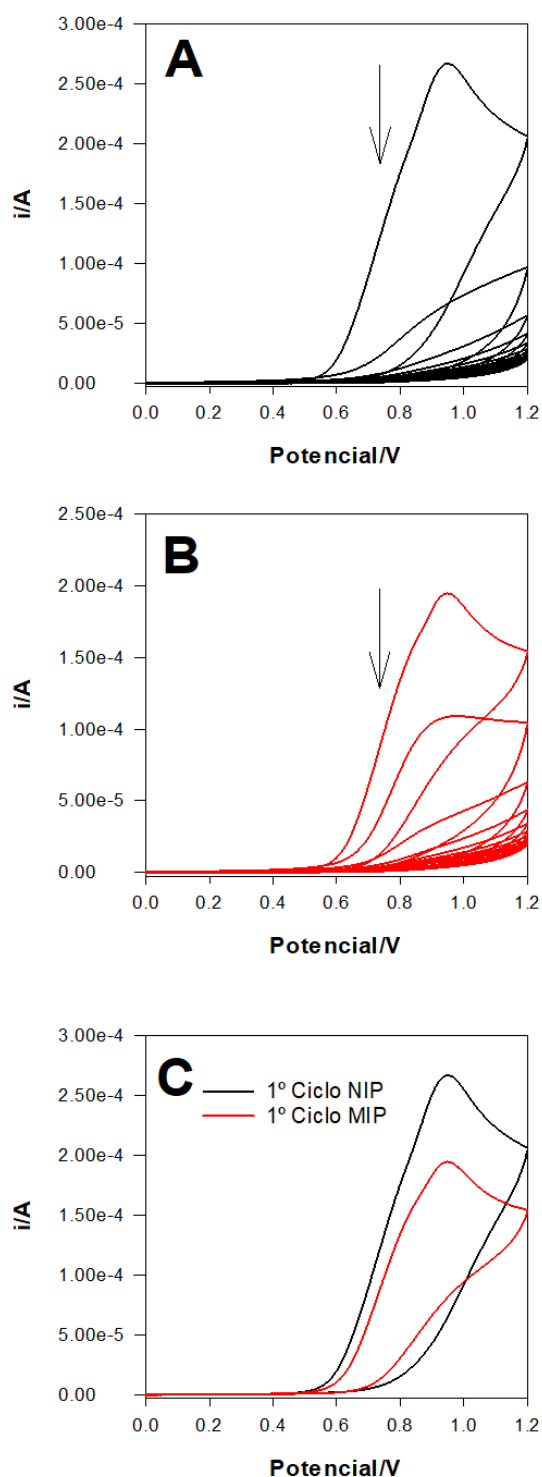


Figura 14-Voltamogramas registados durante polimerização por CV. A) Voltamogramas da polimerização de um NIP; B) Voltamograma da polimerização de um MIP; C) Primeiro ciclo de polimerização de um NIP e um MIP

do polímero pirrol é irreversível. Também se verifica ao longo do crescente número de

varrimentos que há uma diminuição da intensidade do pico de oxidação, demonstrando desta maneira a formação de sucessivas camadas de polímero na superfície do eletrodo. Através das análises dos gráficos A e B da Figura 14 ainda é possível observar que aquando da polimerização sem proteína, NIP, entre o 1º e o 2º picos há um grande diminuição que confirma a formação rápida de camadas do polímero na superfície do eletrodo, enquanto que entre o 1º e 2º picos do gráfico B da Figura 14, não há uma descida tão acentuada, pelo que se pode afirmar que tal se deve à presença da proteína durante a eletropolimerização e a sua interação com o pirrol.

Ainda na Figura 14, no gráfico C, é bem evidente uma diferença significativa entre o pico de oxidação do pirrol no 1º ciclo de polimerização para o NIP quando comparado com o MIP, no caso do MIP a intensidade é significativamente inferior. Mais uma vez este resultado sugere uma interação forte entre pirrol e Ara h 1 e, portanto, uma maior dificuldade de oxidação do pirrol.

Em suma, os resultados da polimerização com polímero pirrol e proteína Ara h 1 (MIP) demonstram uma boa capacidade de interação, sendo um aspeto positivo para a preparação do polímero molecularmente impresso, para que se possa assegurar uma boa seletividade.

Após a polimerização dos filmes obtidos utilizou-se a técnica DPV, usando-se a solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0,1M. De seguida iniciou-se o processo de extração com o recuso da solução de 1% SDS, durante 2h, e passado este intervalo de tempo efetuou-se a leitura

do sinal por DPV, voltando a usar-se solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os resultados tanto após a polimerização como após a extração estão representados na Figura 15.

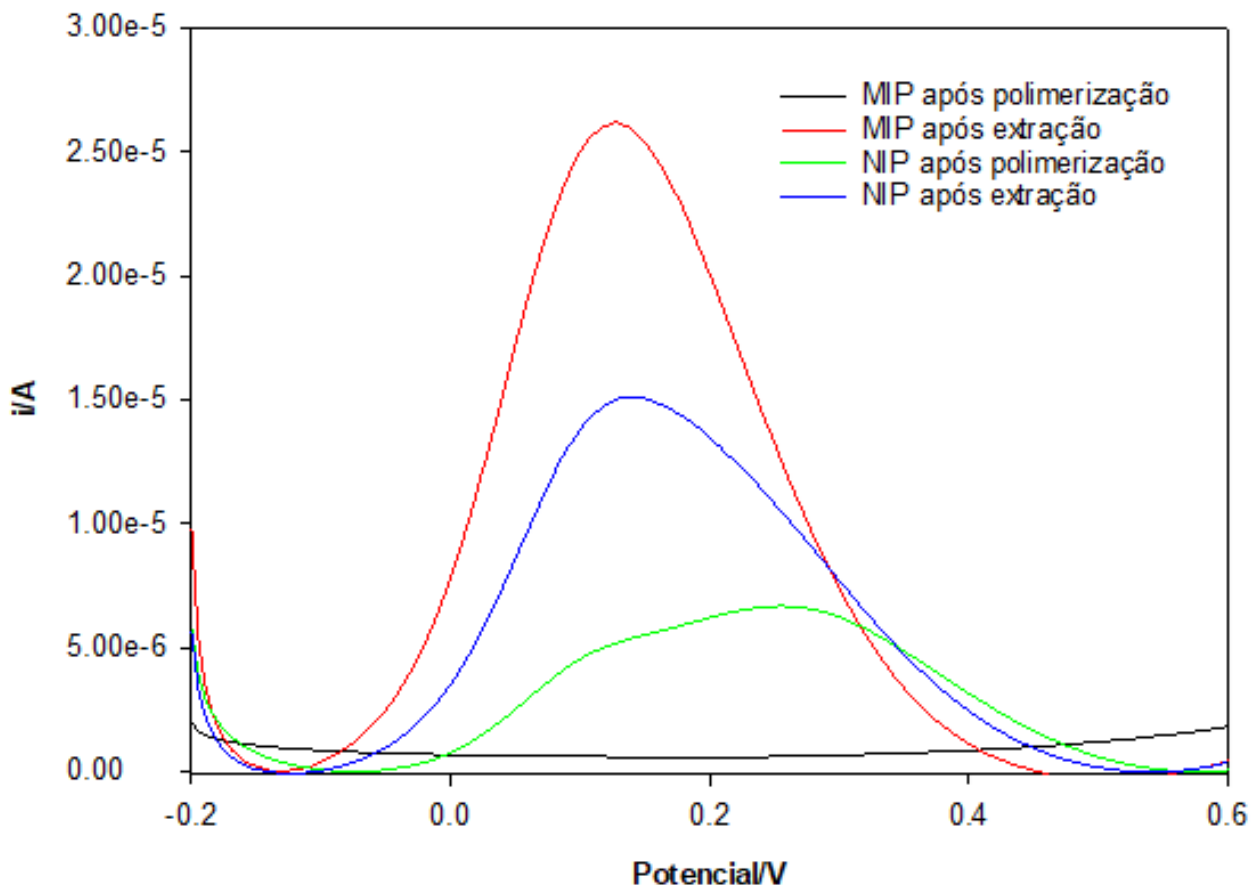


Figura 15-Voltamogramas DPV do NIP e MIP, após a polimerização e após a extração.

Tal como se pode verificar há um bloqueio da corrente tanto no NIP como no MIP logo após a polimerização. Isto demonstra a formação de filme polimérico na superfície de ambos os elétrodos de carbono. Verifica-se ainda que no caso do MIP o bloqueio é total, não se observando pico do par redox, enquanto que no NIP embora com a corrente bloqueada existe um ligeiro pico. Estas diferenças podem ser associadas à presença da Ara h 1, contribuindo para um bloqueio maior. Os resultados permitem ainda observar diferenças entre NIP e MIP após a extração. Em ambos os casos, é possível verificar um pico, contudo no caso do MIP este é visivelmente maior. Por um lado, há um ligeiro aumento do NIP, provavelmente devido a alterações que o solvente de extração possa provocar. Por outro lado, esse aumento é significativamente maior no caso do MIP, indicando que para além dos efeitos do solvente no

polímero, a proteína possa ter sido removida e assim se formada as cavidades livres que permitem um maior acesso ao par redox e por consequência maior intensidade do sinal.

4.2.2 Otimização das Condições de Polimerização

O objetivo final da preparação de MIPs por eletropolimerização é otimizá-los de modo, sejam o mais eficientes possível providenciando uma resposta rápida e eficaz.

Desta forma foram estudadas várias condições de polimerização, mais concretamente a concentração de pirrol, a concentração de Ara h 1, o número de ciclos de polimerização, o tempo de extração e o tempo de incubação. Os resultados indicados correspondem diferença das intensidades do pico após a extração com o pico após a incubação com Ara h 1, sendo definido como Δi , usando medições por DPV de uma solução de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em KCl 0,1M.

4.2.2.1 Concentração de Pirrol (Py)

Foram testadas diferentes concentrações do pirrol na solução de polimerização, 0,5, 1, 5, 10, 20 mM.

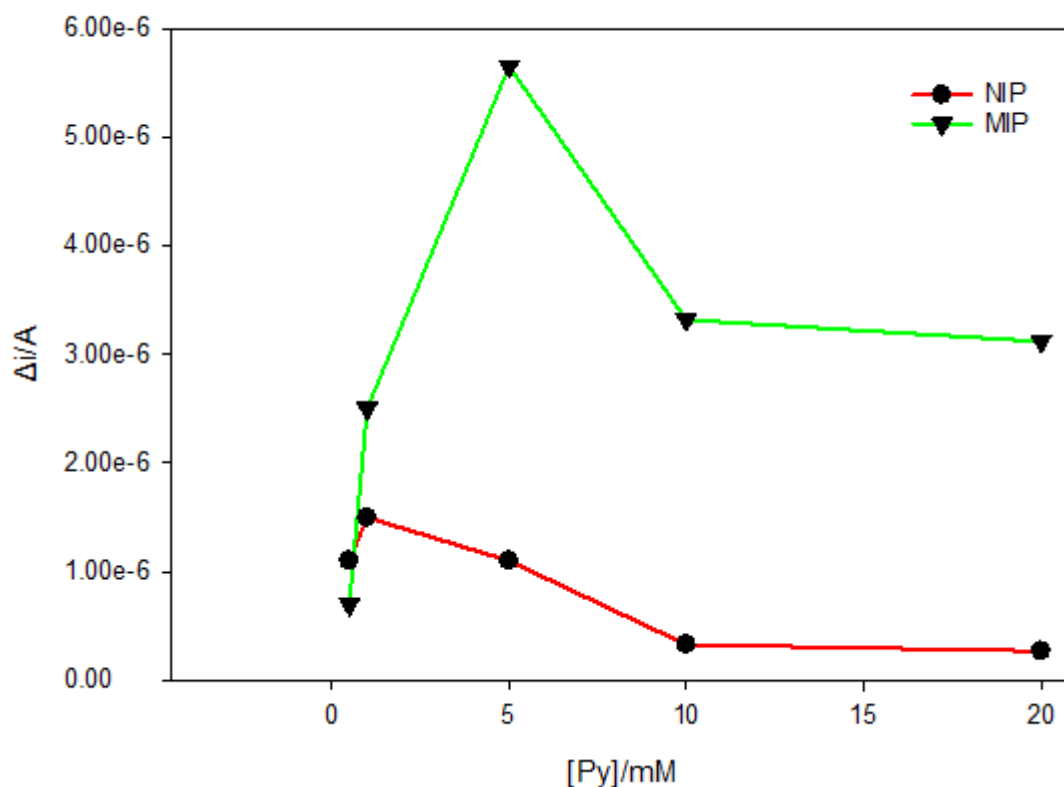


Figura 16-Variação do Δi em função da concentração de pirrol em NIP e MIP

Na Figura 16, está representada a influencia de pirrol, tanto para o NIP como para o MIP, nos resultados da análise.

Para o caso do MIP consegue-se observar que entre as concentrações de 0.5 e 5 mM de pirrol há uma subida acentuada do Δi , sucedendo de uma descida entre 5 e 10 mM e uma estabilização entre 10 e 20 mM.

Relativamente ao NIP, há uma subida inicial do Δi entre as concentrações de 0.5 e 1 mM de pirrol, porém há uma descida gradual entre 1 e 10 mM e uma estabilização após este último concentrado até aos 20 mM.

Analisando a Figura 16, verifica-se que para a concentração de pirrol mais baixa, o NIP, resulta numa Δi superior do MIP. A concentração do monómero que fornece uma melhor Δi , e uma maior diferença entre MIP e NIP é a concentração de 5 mM.

4.2.2.2 Concentração de Ara h 1

Relativamente à concentração ótima de Ara h 1, foram testadas várias concentrações: 2, 20, 200, 2000 e 20000 $\mu\text{g/mL}$. Na Figura 17, esta apresentado um gráfico de barras relativos à otimização da concentração da Ara h 1.

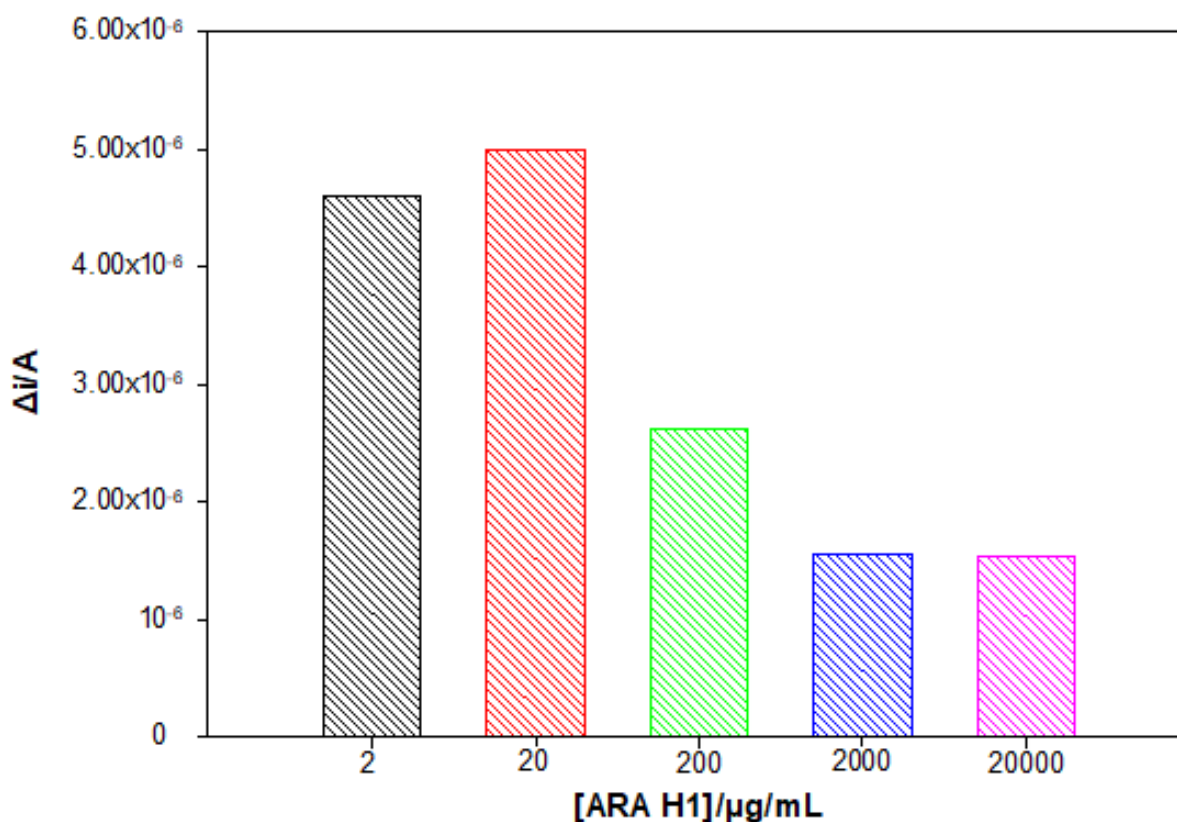


Figura 17- Variação do Δi em função da concentração de Ara h 1 para o MIP

Observando a Figura 17, consegue-se concluir que a melhor concentração de proteína é a de 20 $\mu\text{g/mL}$. Aparentemente concentrações mais baixas de Ara h 1 durante a preparação do MIP, permitem uma boa resposta analítica que, no entanto, é ligeiramente inferior quando se utiliza uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Como existe um ligeiro aumento entre 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$ não se testaram concentrações mais baixas do que 2 $\mu\text{g/mL}$.

Para concentrações de Ara h 1 mais altas, quantidades elevadas de proteína podem ter sido impressas no polímero, que posteriormente tornem a sua extração difícil ou incompleta, levando a uma menor resposta analítica. Outra explicação pode estar relacionada com o facto de muita proteína na polimerização levar à formação de demasiadas cavidades muito próximas que possam diminuir a qualidade de interação e de ligação à proteína. É sabido que o “espaçamento” entre as cavidades específicas formadas num MIP é dos fatores mais importantes na sua capacidade de resposta.

4.2.2.3 Número de Ciclos

Em eletropolimerização os números de ciclos de varrimento de potencial utilizados na CV vão controlar a espessura do filme polimérico. Assim sendo, foram testados diferentes ciclos: 5, 10, 15, 20 e 30. Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 18.

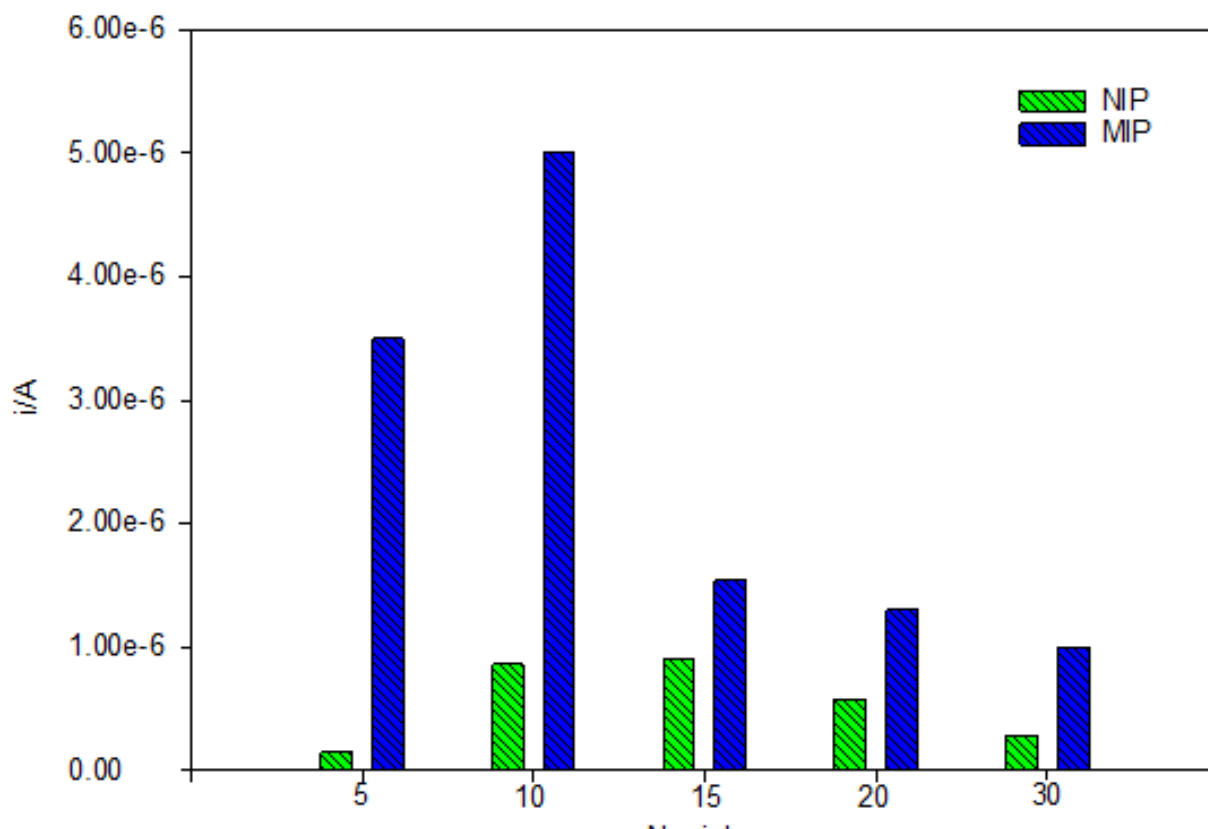


Figura 18-Variação do Δi em função do número de ciclos, NIP (as barras verdes) o MIP (barras azuis)

Através da análise da Figura 18 observa-se que a Δi do NIP aumentou de 5 a 15 ciclos e desceu no número de ciclos 20 e 30. No caso MIP, os melhores valores são encontrados para número de ciclos mais baixos, 5 e 10, sendo que depois existe uma grande diminuição. A maior diferença entre MIP e NIP, assim como a maior resposta do MIP foi registada para os 1º ciclos de polimerização. Por este motivo, foram escolhidos 10 ciclos de polimerização para as etapas de otimização.

O facto de a resposta ser muito menor para um número de ciclos maiores pode estar relacionado com dois fatores. Por um lado, quanto maior a espessura, maior será o bloqueio da corrente que se observa devido à formação de camadas menos condutoras, sendo evidente para a resposta do NIP, por outro lado, maior espessura do polímero pode levar a que a proteína fique mais “presa” e com maiores dificuldades de ser removida, que por sua vez, a sua resposta analítica será menor.

4.2.2.4 Solventes de extração

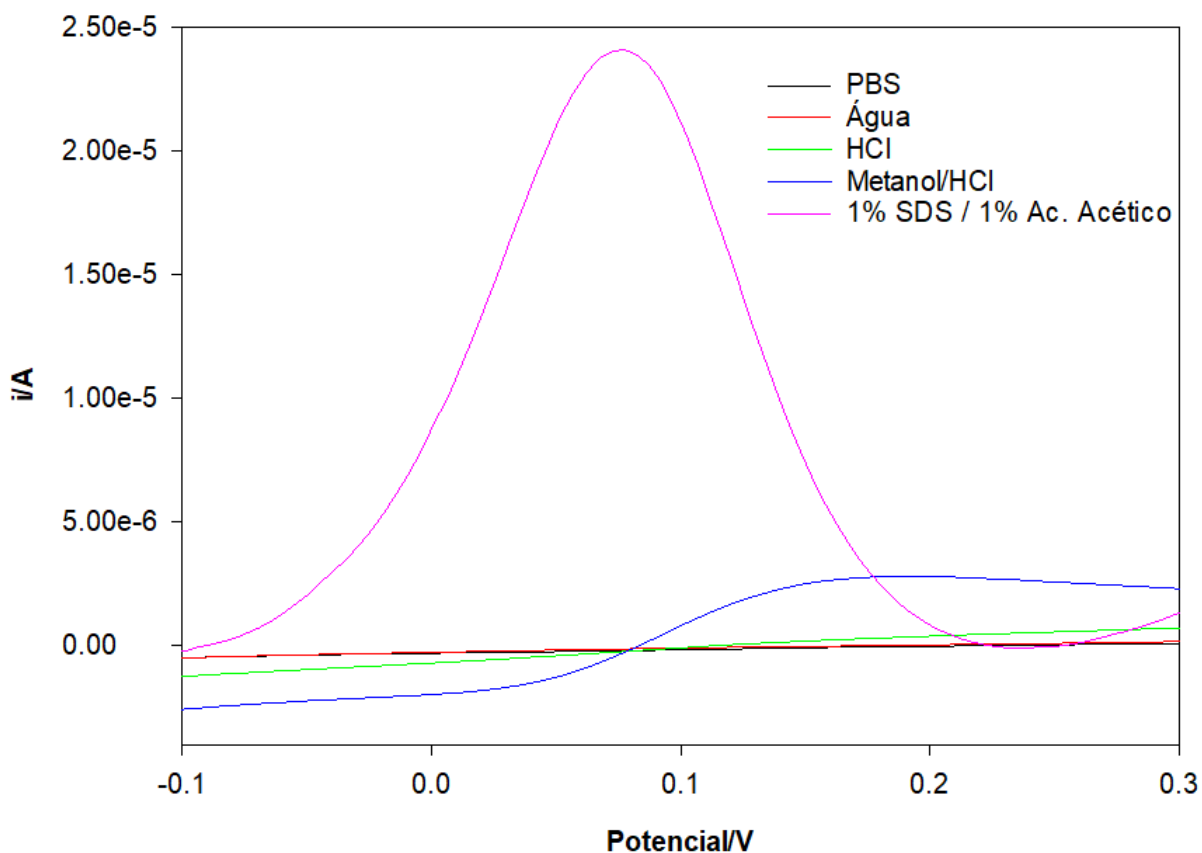


Figura 19-Voltamogramas DPV de solventes de extração, após extração

Foram testados diferentes tipos de solventes de extração, de forma a tornar a extração do analito do MIP mais eficiente. Foram testados 10 μ l dos 5 tipos de solventes: água, solução tampão 0.1 M de pH7, HCl, Metanol/HCl e 1% SDS/1% Ácido acético. Os voltamogramas obtidos após a extração com os solventes referidos estão representados na Figura 19.

A medição do sinal foi realizada pela a técnica de DPV com a solução de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em KCl 0.1M. É evidente pelos resultados obtidos que a água ultrapura, o tampão fosfato (PBS) e a solução de HCl não extraíram a Ara h 1 dos filmes poliméricos, pois praticamente não foi possível observar o pico do par redox, pelo que se pode concluir que a proteína continua no filme polimérico bloqueando o sinal. Quando se usa Metanol/HCl é possível verificar um pico de oxidação, pelo que esta solução mostrou capacidade para a remoção da proteína. O mesmo acontece quando se usa 1% SDS/1% Ácido acético, mas neste

caso o pico apresenta uma intensidade muito superior, pelo que este solvente se mostrou mais eficaz. Deste modo esta foi a solução utilizada para se efetuar as extrações necessárias.

4.2.2.5 Tempo de Extração

Além dos solventes de extração, outro parâmetro importante é o tempo de extração. Assim os tempos de extração foram estudados, utilizando-se tempos de 15 min, 30min, 1h, 2h e 4h. O melhor resultado foi obtido para um tempo de extração de 2h. Este foi utilizado para todas as extrações seguintes.

4.2.2.6 Tempos de Incubação

O tempo de incubação é outro parâmetro que também deve ser estudado, para se verificar qual o período de tempo mais curto a que a proteína consegue ser incubada, mas de forma eficiente. Verificou-se que um tempo de incubação de 15 min foi suficiente para obter uma resposta analítica.

4.2.3 Caracterização do Sensor

A caracterização da superfície do SPCE após as modificações para a formação do sensor foi realizada através de medições CV utilizando sempre uma solução de 1mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão fosfato. A Figura 20 foi elaborada pela medição em cada etapa da construção e funcionamento do sensor.

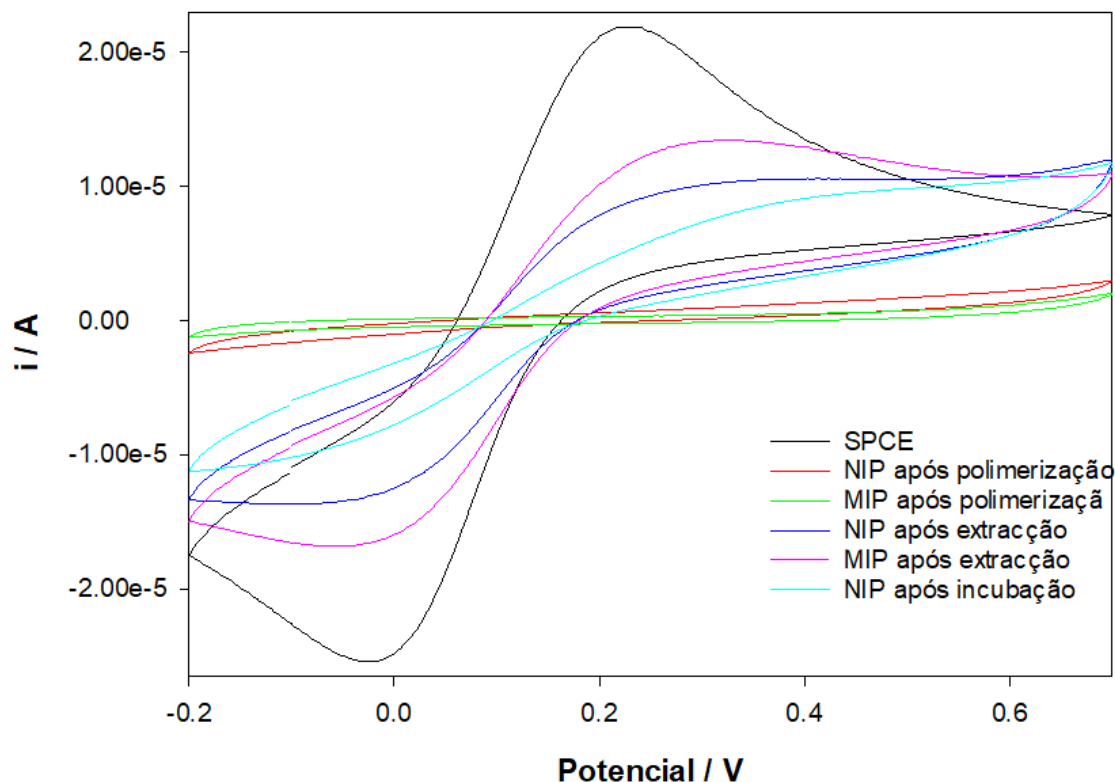


Figura 20- Caracterização de cada etapa da construção dos sensores NIP e MIP

Inicialmente há dois picos de redox bem visíveis no gráfico da Figura 20, estes correspondem ao eletrodo não modificado, ou seja, correspondem ao eletrodo que não foi exposto, nem a uma solução de monómeros, nem a uma solução com proteína. Após a polimerização, tanto no NIP como no MIP, há um desaparecimento dos picos, indicando um bloqueio por parte do polímero da superfície dos sensores não permitindo a realização de transferência eletrônica. Após a extração, os picos redox voltam a aparecer, tanto para o MIP como para o NIP mas com maior aumento no primeiro. Posteriormente à extração existem tanto modificações no polímero que afetam as suas características como a porosidade, facilitando a difusão da solução de ferro até à superfície do eletrodo de forma a possibilitar a reação redox pelo que se verificam picos para o NIP, como também a remoção da proteína no caso do MIP, o que torna os seus picos maiores devido à formação de cavidades. Um dado importante a ser verificado é que mesmo os picos redox para o MIP apresentam intensidades muito diferentes e mais baixas que no caso do eletrodo não modificado. Este dado é relevante para se perceber que o polímero não é removido do eletrodo com a extração, pois se fosse observar-se-ia um comportamento após extração muito próximo do eletrodo não modificado. Por fim, após a

incubação do MIP com Ara h 1 é possível verificar uma nova diminuição da intensidade de corrente dos picos devido ao maior bloqueio e preenchimento de cavidades. Isto mostra a capacidade de ligação da Ara h 1 ao MIP.

4.2.4 Retas de calibração

A fim de estabelecer a reta de calibração para a análise de Ara h 1 foram utilizadas soluções com diferentes concentrações de proteína, compreendidas entre 0 e 200 ng/mL. O estudo foi realizado depois das incubações de soluções com concentrações diferentes terem sido efetuadas, usando sempre DPV para a medição de sinal e usando as condições otimizadas anteriormente. Os voltamogramas respectivos estão evidenciados na Figura 21

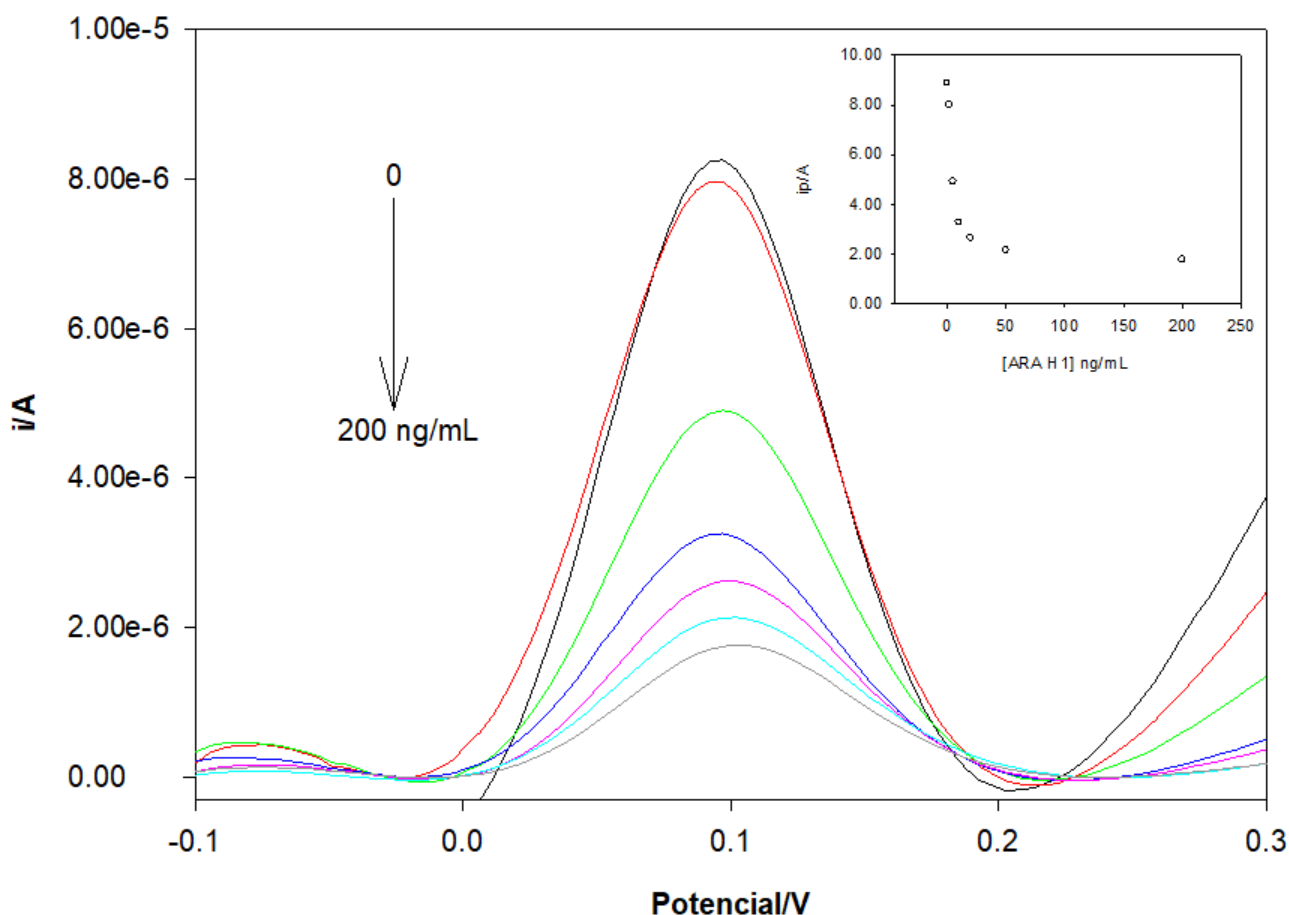


Figura 21-Resposta do MIP às diferentes concentrações de Ara h 1

Pela observação da Figura 21, é notória a redução da intensidade de corrente do pico com o aumento gradual da concentração de cada solução de Ara h 1, mostrando que o sensor MIP responde de forma eficiente ao aumento das concentrações.

Estes dados foram usados para a construção da curva de calibração (Figura 22).

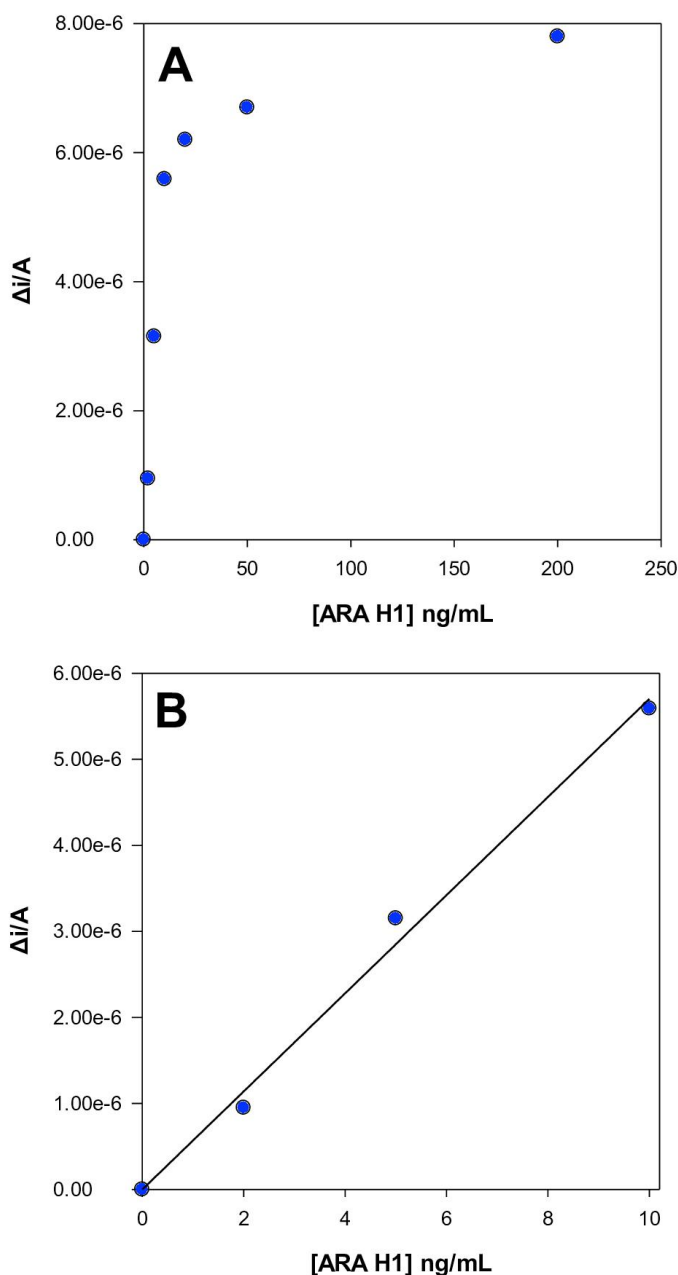


Figura 22-Curva de calibração do sensor MIP

Na Figura 22, estão representados dois gráficos ambos do sensor MIP, porém no gráfico A, tem-se a gama de concentrações até 200 ng/mL, onde é possível observar uma saturação do sinal deixando, deste modo, de existir uma relação linear entre a concentração e o sinal obtido. Contudo no gráfico B são os valores que estão apresentados no gráfico A (Figura 22), contudo só até à concentração de 10 ng/mL que é a zona onde o sinal é linear, ou seja, consoante o aumento da concentração de Ara h 1, há um aumento de intensidade. Para esta zona foi obtido

um comportamento linear entre Δi a concentração, com uma equação da reta $y = 5,704 \times 10^{-7}x - 1,498 \times 10^{-9}$ e um $r^2 = 0,9947$.

Contudo, a curva de calibração na zona linear só foi realizada com 4 pontos pelo que novos ensaios deverão ser realizados para incluir mais concentrações nesta gama. É também de referir que a gama de concentrações onde existe resposta linear é estreita.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

As alergias alimentares continuam a ser um tema de grande debate e preocupação apesar dos avanços que se têm vindo a desenvolver e, através da revisão bibliográfica, verifica-se que há um aumento cada vez mais crescente de preocupação de pessoas que apresentem sensibilidade a alérgenos. Este aumento, já sendo preocupante, tornou-se um gatilho para o investimento na investigação e terapias no grande tema das alergias. Inclusive a investigação de como atua e os efeitos do Ara h 1.

Do mesmo modo, os sensores e as suas aplicações continuaram a ter um crescimento exponencial de estudo. Os MIPs, são elementos sensoriais que apresentam elevada afinidade a proteínas e moléculas alvo com uma facilidade de manuseamento, um baixo custo, boa estabilidade, boa flexibilidade aquando a escolha dos monómeros a ser usados no mesmo e um leque de técnicas de polimerização que se podem usar. Este conjunto de posições favoráveis, torna assim os MIPs um alvo de estudo e uma enorme capacidade de serem usados em tempo real em pacientes ou em outros elementos, como o caso de alimentos.

Neste trabalho, um eléctrodo de carbono SPE foi modificado como um MIP (polipirrol) para a deteção e quantificação de uma proteína alérgica, a Ara h 1. A preparação do MIP foi realizada com sucesso por eletropolimerização. Vários parâmetros da polimerização foram estudados e otimizados.

A concentração de proteína na solução de polimerização foi alvo de estudo, verificando-se para concentrações mais baixas de 2 e 20 $\mu\text{g/mL}$, evidenciava-se melhores resultados.

De seguida estudou-se também o número de ciclos de polimerização tendo-se verificado que a melhor resposta analítica foi obtida para 10 ciclos.

Foram ainda realizados estudos de otimização das condições de extração da Ara h 1 após polimerização, tendo-se concluído que a melhor resposta se obteve após 2h de extração usando uma solução de 1% SDS com 1% de ácido acético.

Realizou-se uma caracterização por CV das modificações do eletrodo passo a passo, comprovando-se a modificação do eletrodo com o MIP e a eficácia da resposta na presença de Ara h 1.

Por fim foi estudada a resposta analítica, aplicando-se a técnica de DPV, numa gama entre 2 e 200 ng/mL, após este valor, há uma estabilização na intensidade dos picos de oxidação e não se verifica aumento da resposta com a concentração.

O funcionamento deste sensor terá de ser do tipo ensaio único e descartável. Isto porque após a realização de sucessivas análises os sensores começavam a perder a sua capacidade e apresentando diminuição da resposta à Ara h 1. Após cada extração as análises acabavam por ser pouco diferentes dificultando a obtenção de um sinal constante. Ou seja, após a preparação do MIP e extração, conseguiu-se medir a resposta analítica com eficácia, contudo na tentativa de regeneração do sensor realizando nova extração, não foi possível observar nova resposta.

Existiram alguns entraves na execução neste projeto, começando pela interrupção do estudo devido ao novo vírus, SARS-CoV-2, que provocou o encerramento das instalações do GRAQ durante dois meses, atrasando a obtenção dos resultados experimentais. Devido às limitações do tempo, não foi possível a realização de mais ensaios para construir uma curva de calibração com mais pontos na gama linear, assim como a realização de ensaios de seletividade e aplicação em amostras reais.

Em conclusão, é importante em trabalhos futuros o estudo de concentrações diferentes de proteína para uma melhor curva de calibração e a realização da aplicação em amostras alimentares para se avaliar a capacidade de este sensor para poder vir a ter potencial para a comercialização.

Referências

- 1 H. Sicherer, K. Allen, G. Lack, S. L. Taylor, S. M. Donovan, and M. Oria, “Critical issues in food allergy: A national academies consensus report,” *Pediatrics*, vol. 140, no. 2, 2017. [Online]. Available: <https://pediatrics.aappublications.org/content/140/2/e20170194>.
- 2 C. Sara, “Estágio de alergia alimentar,” *Revista de Imunoalergia*, vol. XVIII, no. 1, 2020;28(1):59-62. [Online]. Available: [https://www.spaic.pt/client_files/rpia/\(31\).pdf](https://www.spaic.pt/client_files/rpia/(31).pdf)
- 3 Eigenmann, PA, Akdis, C, Bousquet, J, Grattan, CE, Hoffmann-Sommergruber, K, Jutel, M. Food and drug allergy, and anaphylaxis in EAACI journals (2018). *Pediatr Allergy Immunol*. 2019; 30: 785– 794. <https://doi.org/10.1111/pai.13125>
- 4 Gaspar, Ângela, Santos, Natacha, Faria, Emília, Câmara, Rita, Rodrigues-Alves, Rodrigo, Carrapatoso, Isabel, Gomes, Eva, Pereira, Ana Margarida, Carneiro-Leão, Leonor, Morais-Almeida, Mário, Delgado, Luís, Pedro, Elisa, & Branco-Ferreira, Manuel. (2019). Anafilaxia em Portugal: 10 anos de Registo Nacional da SPAIC 2007-2017. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 27(4), 289-307. Recuperado em 29 de outubro de 2020, de http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-97212019004400003&lng=pt&tlng=pt.
- 5 Koppelman, S., Smits, M., Tomassen, M., de Jong, G., Baumert, J., Taylor, S., ... Wichers, H. (2018). Release of Major Peanut Allergens from Their Matrix under Various pH and Simulated Saliva Conditions—Ara h2 and Ara h6 Are Readily Bio-Accessible. *Nutrients*, 10(9), 1281. doi:10.3390/nu10091281
- 6 Koppelman, S. J., Smits, M., Tomassen, M., de Jong, G., Baumert, J., Taylor, S. L., Witkamp, R., Veldman, R. J., Pieters, R., & Wichers, H. (2018). Release of Major Peanut Allergens from Their Matrix under Various pH and Simulated Saliva Conditions-Ara h2 and Ara h6 Are Readily Bio-Accessible. *Nutrients*, 10(9), 1281. <https://doi.org/10.3390/nu10091281>
- 7 Johansson SG, Bieber T, Dahl R, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004 May;113(5):832-836. DOI: 10.1016/j.jaci.2003.12.591
- 8 M. Fernandes, P. Guilhermino, “Alergias Alimentares,” p. 64p, 2008. [Online]. Disponível: <http://biblionet.cm-castroverde.pt/Opac/Pages/Document/DocumentCitation.aspx?UID=0409ad75-f29e-4e22-aba2-c122d5591ee1&DataBase=10365 BM MONO>
- 9 F., Estelle, & R., Simons. (2006). Anaphylaxis, killer allergy: Long-term management in the community. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 367-377. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.12.002>.

- 10 L. Carneiro-Leão, N. Santos, Ângela Gaspar, G. de interesse de “Anafilaxia da SPAIC, “Letter to the editor: Anaphylaxis, diagnosis and treatment,” *Acta Médica Portuguesa*, vol. 31, no. 2, pp. 134–135, 2018.
- 11 Koplin, Jennifer J, & Davis, Carla M. (2020). Food Allergy: More Than Peanut. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, Volume 8, Issue 1, 68-69. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.001>
- 12 Anvari, S., Miller, J., Yeh, C. et al. IgE-Mediated Food Allergy. *Clinic Rev Allerg Immunol* **57**, 244–260 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8710-3>
- 13 Renz, H., Allen, K. J., Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Lack, G., Beyer, K., & Oettgen, H. C. (2018). Food allergy. *Nature reviews. Disease primers*, 4, 17098. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>
- 14 Bousquet, J, Akdis, CA, Grattan, C, et al. Highlights and recent developments in airway diseases in EAACI journals (2018). *Allergy*. 2019; 74: 2329– 2341. <https://doi.org/10.1111/all.14068>
- 15 Ferreira, Fátima, & Inácio, Filipe. (2018). Patologia associada ao trigo: Alergia IgE e não IgE mediada, doença celíaca, hipersensibilidade não celíaca, FODMAP. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 26(3), 171-187. Recuperado em 29 de outubro de 2020, de http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-97212018000300002&lng=pt&tlng=pt.
- 16 Berin, M. C., & Sampson, H. A. (2013). Food allergy: an enigmatic epidemic. *Trends in immunology*, 34(8), 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.003>
- 17 Marsteller, Nathan L., Goodman, Richard E., Andoh-Kumi, Kwane, Luan, Fulei, Bogh, Katrine L., & Baumert, Joseph. (2020). Evaluating the potential allergenicity of dietary proteins using model strong to non-allergenic proteins in germ-free mice. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 141. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111398>
- 18 Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., Fenton, M. J., Arshad, S. H., Bahna, S. L., Beck, L. A., Byrd-Bredbenner, C., Camargo, C. A., Jr, Eichenfield, L., Furuta, G. T., Hanifin, J. M., Jones, C., Kraft, M., Levy, B. D., ... NIAID-Sponsored Expert Panel (2010). Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(6), 1105–1118. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.008>
- 19 Iweala, O. I., & Nagler, C. R. (2019). The Microbiome and Food Allergy. *Annual review of immunology*, 37, 377–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041621>
- 20 Marzano V, Tilocca B, Fiocchi AG, et al. Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteomics*. 2020 Mar;215:103636. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103636

- 21 Yu, W., Freeland, D. & Nadeau, K. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **16**, 751–765 (2016). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.111>
- 22 Wu, L. C., & Zarrin, A. A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 14(4), 247–259. <https://doi.org/10.1038/nri3632>
- 23 Oettgen H. C. (2016). Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(6), 1631–1645. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.009>
- 24 He, J. S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S. P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah Hamadee, N., Lum, J., Lee, A., Chen, J., Poidinger, M., Zolezzi, F., Lafaille, J. J., & Curotto de Lafaille, M. A. (2017). IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nature communications*, 8(1), 641. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00723-0>
- 25 Balbino, B., Conde, E., Marichal, T., Starkl, P., & Reber, L. L. (2018). Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 191, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.015>
- 26 Ho, M. H., Wong, W. H., & Chang, C. (2014). Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 46(3), 225–240. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8339-6>
- 27 Sampson, H. A., Muñoz-Furlong, A., Campbell, R. L., Adkinson, N. F., Jr, Bock, S. A., Branum, A., Brown, S. G., Camargo, C. A., Jr, Cydulka, R., Galli, S. J., Gidudu, J., Gruchalla, R. S., Harlor, A. D., Jr, Hepner, D. L., Lewis, L. M., Lieberman, P. L., Metcalfe, D. D., O'Connor, R., Muraro, A., Rudman, A., ... Decker, W. W. (2006). Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *Annals of emergency medicine*, 47(4), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2006.01.018>
- 28 Koppelman, S. J., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A. C., & Knol, E. F. (2004). Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(4), 583–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1923.x>
- 29 Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R. M., Wal, J. M., & Bernard, H. (2005). Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4547–4553. <https://doi.org/10.1021/jf050091p>
- 30 Montserrat, M., Mayayo, C., Sánchez, L., Calvo, M., & Pérez, M. D. (2013). Study of the thermoresistance of the allergenic Ara h1 protein from peanut (*Arachis hypogaea*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(13), 3335–3340. <https://doi.org/10.1021/jf305450s>

- 31 Yusnawan, E., Marquis, C. P., & Lee, N. A. (2012). Purification and characterization of Ara h1 and Ara h3 from four peanut market types revealed higher order oligomeric structures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(41), 10352–10358. <https://doi.org/10.1021/jf302800e>
- 32 Maleki, S. J., Kopper, R. A., Shin, D. S., Park, C. W., Compadre, C. M., Sampson, H., Burks, A. W., & Bannon, G. A. (2000). Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(11), 5844–5849. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5844>
- 33 Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R. M., Wal, J. M., & Bernard, H. (2005). Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4547–4553. <https://doi.org/10.1021/jf050091p>
- 34 Blanc, F., Vissers, Y. M., Adel-Patient, K., Rigby, N. M., Mackie, A. R., Gunning, A. P., Wellner, N. K., Skov, P. S., Przybylski-Nicaise, L., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L., Szépfalusi, Z., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A. P., Bernard, H., Wal, J. M., Savelkoul, H. F., Wichers, H. J., & Mills, E. N. (2011). Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Molecular nutrition & food research*, 55(12), 1887–1894. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100251>
- 35 Hulanicki, A., Glab, S., & Ingman, F. (1991). Chemical sensors: definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry*, 63(9), 1247-1250. doi: <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>
- 36 Silva, Marta Sofia Vieira da. (2015). Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a monitorização de cancro da mama Orientadores [Master's thesis, Instituto Superior de Engenharia do Porto]. <http://hdl.handle.net/10400.22/8073>.
- 37 Albert, K. J., Lewis, N. S., Schauer, C. L., Sotzing, G. A., Stitzel, S. E., Vaid, T. P., & Walt, D. R. (2000). Cross-reactive chemical sensor arrays. *Chemical reviews*, 100(7), 2595–2626. <https://doi.org/10.1021/cr980102w>
- 38 Jiménez, Daniel & Díaz-Díaz, Goretti & Blanco-López, Maria Carmen & Lobo-Castañón, Maria Jesus & Miranda, Arturo & Tuñón-Blanco, Paulino. (2012). Chapter 1 - Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Past, Present, and Future. 10.1016/B978-0-444-56331-6.00001-3
- 39 Paolesse, R., Nardis, S., Monti, D., Stefanelli, M., & Di Natale, C. (2017). Porphyrinoids for Chemical Sensor Applications. *Chemical reviews*, 117(4), 2517–2583. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00361>
- 40 BelBruno J. J. (2019). Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical reviews*, 119(1), 94–119. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
- 41 Chai, Jingdang & Zhang, Jie & Wen, Yangping & Zou, Lie & Zhang, Xinxin & Xin, Xing & Zhou, Muhan & Xu, Jingkun & Zhang, Ge. (2019). Highly Sensitive Electrochemical Sensor

- Based on PEDOT:PSS- β -CD-SWCNT-COOH Modified Glassy Carbon Electrode Enables Trace Analysis Shikonin. *Journal of The Electrochemical Society*. 166. B388-B394. 10.1149/2.0471906jes.
- 42 Karimi-Maleh, H., Karimi, F., Alizadeh, M., & Sanati, A. L. (2020). Electrochemical Sensors, a Bright Future in the Fabrication of Portable Kits in Analytical Systems. *Chemical record (New York, N.Y.)*, 20(7), 682–692. <https://doi.org/10.1002/tcr.201900092>
- 43 To Thi Kim, L., Debiemme-Chouvy, C., Gabrielli, C., & Perrot, H. (2012). Redox switching of heteropolyanions entrapped in polypyrrole films investigated by ac electrogravimetry. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28(38), 13746–13757. <https://doi.org/10.1021/la302115f>
- 44 Norte, L. & Carvalho, Emerson & Tappin, Marcelo & Borges, P.. (2018). Evaluation of measurement uncertainty for purity of a monoterpene acid by small-scale coulometry. *Journal of Physics: Conference Series*. 975. 012007. 10.1088/1742-6596/975/1/012007.
- 45 Lubert, K.-H. and Kalcher, K. (2010), History of Electroanalytical Methods. *Electroanalysis*, 22: 1937-1946. doi:10.1002/elan.201000087
- 46 Subject: Basics of Voltammetry and Polarography (n.d.). Application Note P-2. Web: www.princetonappliedresearch.com
- 47 Subject: Basics of Voltammetry and Polarography (n.d.). Application Note E-4. Web: www.princetonappliedresearch.com
- 48 Liu, Jiapeng & Ciucci, Francesco. (2019). The Gaussian process distribution of relaxation times: A machine learning tool for the analysis and prediction of electrochemical impedance spectroscopy data. *Electrochimica Acta*. 331. 135316. 10.1016/j.electacta.2019.135316.
- 49 Chooto, Pipat. (2019). Cyclic Voltammetry and Its Applications. 10.5772/intechopen.83451.
- 50 Scott, K. (2016). Electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems.
- 51 Mincu, N.-B., Lazar, V., Stan, D., Mihailescu, C. M., Iosub, R., & Mateescu, A. L. (2020). Screen-Printed Electrodes (SPE) for In Vitro Diagnostic Purpose. *Diagnostics*, 10(8), 517. <https://doi:10.3390/diagnostics10080517>
- 52 García-González , Raquel, Fernández-Abedul, M. Teresa , Pernía, Alberto , & Costa-García, Agustín . (2008). Electrochemical characterization of different screen-printed gold electrodes. *Electrochimica Acta*, Volume 53, Issue 8, 3242 - 3249. ISSN 0013-4686, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.07.059>
- 53 Liu, Guozhen, Böcking, Till, & Gooding, J. Justin. (2007). Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 600, Issue 2, 335 - 344. ISSN 1572-6657, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072806005468>

- 54 Guizhen Li & Kyung Ho Row (2018) Recent Applications of Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) on Micro-extraction Techniques, Separation & Purification Reviews, 47:1, 1-18, DOI: [10.1080/15422119.2017.1315823](https://doi.org/10.1080/15422119.2017.1315823)
- 55 Motia, S., Bouchikhi, B., Llobet, E., & El Bari, N. (2020). Synthesis and characterization of a highly sensitive and selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer with gold nanoparticles modified screen-printed electrode for glycerol determination in wastewater. *Talanta*, 216, 120953. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120953>
- 56 Lv, Y., Tan, T., & Svec, F. (2013). Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules. *Biotechnology advances*, 31(8), 1172–1186. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.02.005>
- 57 Silva, H. F. F. da. (2012). *Deteção eletroquímica da norfloxacin e trimetoprim em amostras de urina utilizando polímero molecularmente impresso modificado e grafeno* (Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Porto). Retrieved from <https://recipp.ipp.pt/handle/10400.22/3289>
- 58 DropSens. 2019. “Screen-printed electrodes”. DropSens. http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html
- 59 Zembruska, Dorota, Kalecki, Jakub, Cieplak, Maciej, Lisowski, Wojciech, Borowicz, Pawel, Noworyta, Krzysztof, & Sharma, Piyush Sindlu. (2019). Electrochemically initiated copolymerization of monomers of different oxidation potentials for molecular imprinting of electroactive analyte. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 298. ISSN 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126884>
- 60 Jain, Rajeev, Jadon, Nimisha, & Pawaiya, Archana. (2017). Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 97, 363 - 373. ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.009>
- 61 Pacheco, J. 2017. MIPs “Molecularly Imprinted Polymers”. *Biosensores. ISEP*.